

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 29 日 (29.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/089800 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 31/7088, 48/00, A61P 19/02, 25/00, 29/00, 35/00 // C12N 15/09

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005311

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 16 日 (16.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-076931 2004 年 3 月 17 日 (17.03.2004) JP  
特願 2004-314364  
2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ロコモジェン (LOCOMOGENE, INC.) [JP/JP]; 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4-1-1 虎ノ門パストラル本館 7 階 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

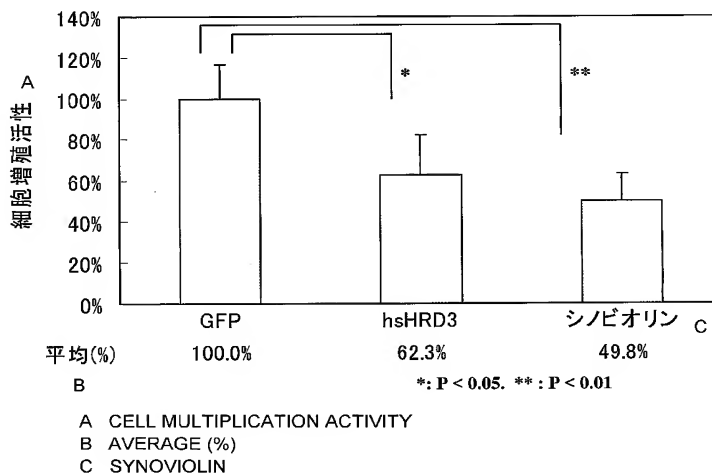
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島 利博 (NAKAJIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒2240001 神奈川県横浜市都筑区中川 1-2-5 港北ガーデンヒルズ A 棟 503号 Kanagawa (JP). 天野 徹也 (AMANO, Tetsuya) [JP/JP]; 〒2140005 神奈川県川崎市多摩区寺尾台 1-21-16 大滝ハイツ 201号 Kanagawa (JP). 山崎 聡士 (YAMASAKI, Satoshi) [JP/JP]; 〒2250003 神奈川県横浜市青葉区新石川 2-16-7 石川坂マンション 305号 Kanagawa (JP). 八木下 尚子 (YAGISHITA, Naoko) [JP/JP]; 〒2340053 神奈川県横浜市港南区日野中央 2-39-9 コスモ港南台 507号 Kanagawa (JP). 佐々木 研 (SASAKI, Ken) [JP/JP]; 〒2150012 神奈川県川崎市麻生区東百合丘 2-20-6 ファイン東百合ヶ丘 5203 Kanagawa (JP). 加藤 幸裕 (KATO, Yukihiro) [JP/JP]; 〒2420038 神奈川県大和市桜森 2-4-14 レックス相模大塚駅前 205号 Kanagawa

[続葉有]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING hsHRD3

(54) 発明の名称: hsHRD3を含む医薬組成物

細胞増殖活性 A



(57) Abstract: A pharmaceutical composition containing a substance capable of suppressing the multiplication of synovial tissue or synovial cells and the production of interleukin 6. There is provided a pharmaceutical composition capable of suppressing the multiplication of synovial tissue or synovial cells and the production of interleukin 6, which pharmaceutical composition is useful for diagnosing or treating of at least one disease selected from among rheumatism, fibrosis, arthritis, cancer and cranial nerve disorder. Further, there is provided a method of suppressing the multiplication of synovial cells and the production of interleukin 6, characterized in that the expression of hsHRD3 in synovial cells is suppressed.

(57) 要約: 本発明は、滑膜組織又は滑膜細胞の増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物の提供であり、リウマチ、線維症、関節炎、癌及び脳神経疾患から選ばれる少なくとも1つの疾患を診断又は治療するために有用な、滑膜組織又は滑膜細胞の増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する医薬組成物、並びに滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する方法である。



WO 2005/089800 A1



(JP). 張 蕾 (ZHANG, Lei) [JP/JP]; 〒1700003 東京都豊島区駒込 6-9-20 サンコーポ山名 102号 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## hsHRD3を含む医薬組成物

## 5 技術分野

本発明は、シノビオリンと複合体を形成するヒトHrd3オルソログ(hsHRD3)を含む医薬組成物、特にリウマチを診断又は治療するための医薬組成物に関する。

## 背景技術

- 10 関節リウマチ(以下、RA という)は、関節の滑膜組織に異常な増殖が見られる全身性の炎症性疾患である。本発明者は、この滑膜組織の異常増殖に必須の遺伝子としてシノビオリン遺伝子を同定している(WO 02/052007)。

- シノビオリンは、RA 患者由来の滑膜細胞に存在する膜タンパク質であり、RING finger モチーフを有する E3 ユビキチンライゲースをコードするものである。このモチーフは、タンパク質のユビキチン化に重要な役割を果たすが、実際、自己ユビキチン化活性を有すること、P4HA1 というコラーゲン合成に必須のタンパク質のユビキチン化を起こすことが証明されている(WO 02/052007)。また、最近では、シノビオリンが線維症、癌又は脳神経疾患の発症にも関与することが見出されている(Genes Dev. 2003 Vol. 17, p.2436-49)。

- 20 シノビオリンは酵母からヒトまで高度に保存されており、出芽酵母において詳細な解析が行われている。シノビオリンの出芽酵母オルソログであり、コレステロール還元酵素の分解に関わる遺伝子である Hrd1p (HMG-CoA Reductase Degradation 1)は、出芽酵母 Hrd3p(HMG-CoA Reductase Degradation 3)と機能的複合体を形成し、小胞体における異常タンパク質の分解にかかわることが見出されている(J.C.B. 2000. Vol.151, p.69-82)。しかしながら、Hrd3p に関する機能は明らかではない。

25 インターロイキン-6 はインターロイキン-1、TNF- $\alpha$ とともに炎症性サイトカインとよばれ、種々の炎症反応を引き起こすサイトカインである。通常免疫系の細胞により産生されるが、リウマチ滑膜細胞、白血病、骨髄腫など様々な増殖性

- 疾患を引き起こす細胞からも産生され、それらの増殖に必須である。インターロイキン-6 が関与する病気として、リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、骨粗しょう症などがある。インターロイキン-6 は細胞表面に発現するインターロイキン-6
- 5 レセプターに結合する場合もあれば、細胞表面から遊離したレセプターと結合し、レセプターを発現していない細胞に結合することにより、炎症反応を誘導する場合もある。インターロイキン-6 の炎症作用として、B 細胞の抗体産生細胞への分化、肝臓における C-反応性タンパク質産生量の増加、骨髄における血小板の誘導、免疫系細胞の炎症部位への誘導、白血球のアポトーシスへの抵抗性の寄与、
- 10 VEGF の誘導を介した血管の誘導などが挙げられる。最近、インターロイキン-6 とレセプターとの結合を阻害する抗インターロイキン-6 レセプター抗体が作られるようになり、リウマチ、骨髄腫、クローン病などに効果を発揮している。

#### 発明の開示

- 15 本発明は、滑膜細胞の異常増殖やインターロイキン-6 の産生を抑制する物質を含む医薬組成物、及び hsHRD3 を抑制することを特徴とする滑膜細胞の増殖を抑制する方法を提供することを課題とする。

- 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。出芽酵母の hrd3 破壊株において、Hrd1p タンパク質が不安定かつ減少しており、基質が生理学的に安定化かつ増加していることが報告されていることから、ヒト Hrd3p オル
- 20 ソログも、シノビオリンと同様に滑膜組織の異常増殖やインターロイキン-6 の産生に必須であることがわかった。そして、hsHRD3 を用いて、新たな炎症反応の抑制、リウマチ、線維症、関節症、癌及び脳神経疾患等の診断法及び治療法の開発に有効であると考え、本発明を完成するに至った。

- 25 すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物。

滑膜細胞の増殖を抑制する物質としては、例えばシノビオリンの発現阻害物質が挙げられる。シノビオリンの発現阻害物質は、hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質、好ましくは、hsHRD3 をコードする遺伝子に対する

siRNA (small interfering RNA) 又は shRNA(short hairpin RNA)を例示することができる。

具体的には hsHRD3 をコードする遺伝子は、以下の(a)又は(b)の DNA を含むものである。すなわち、

- 5 (a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA  
(b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ hsHRD3 活性を有するタンパク質をコードする DNA である。

さらに、siRNA は、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものであってもよい。

本発明の医薬組成物は、リウマチ、線維症、関節炎、癌及び脳神経疾患から選ばれる少なくとも 1 つの疾患を診断又は治療するために使用される。

(2) 滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖を抑制する方法。

- 15 (3) 滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病又は悪性腫瘍におけるアポトーシスを誘起させる方法。

(4) 滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、肺の線維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制する方法。

- 20 (5) 滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病細胞、骨肉種細胞、悪性腫瘍細胞、免疫系細胞、破骨細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種の細胞からインターロイキン-6 の産生を抑制する方法。

(6) インターロイキン-6 の産生を抑制する物質を含む医薬組成物。

- 25 インターロイキン-6 の産生を抑制する物質としては、例えばシノビオリンの発現阻害物質が挙げられる。シノビオリンの発現阻害物質は、hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質、好ましくは、hsHRD3 をコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA を例示することができる。

具体的には hsHRD3 をコードする遺伝子は、以下の(a)又は(b)の DNA を含むものである。すなわち、

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ hsHRD3 活性を有するタンパク質をコードする DNA である。

- 5      さらに、siRNA は、hsHRD3 をコードする遺伝子の塩基配列のうち一部の配列を標的とするものであってもよい。

本発明の医薬組成物は、リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス及び骨粗しょう症から

- 10    選ばれる少なくとも 1 つの疾患を診断又は治療するために使用される。また、本発明の医薬組成物は炎症反応を抑制することもできる。

上記(2)～(5)記載の方法において、滑膜細胞の hsHRD3 の発現抑制は、例えば hsHRD3 とシノビオリンとの結合阻害により行うことができる。

#### 図面の簡単な説明

- 15    図 1 は、Hrd3p と SEL1L/hsHRD3 のドメイン構造を示す図である。

図 2 は、siRNA による SEIL/hsHRD3 の発現が抑制されたことを示す図である。

図 3 は、SEIL/hsHRD3 の発現抑制により、滑膜細胞の増殖活性が抑制されたことを示す図である。

- 20    図 4 は、SEIL/hsHRD3 の発現抑制により、滑膜細胞のアポトーシスが誘導されたことを示す図である。

図 5 は、SEIL/hsHRD3 の発現抑制により、滑膜細胞へのアポトーシスが誘導されたことを示す図である。

- 25    図 6 は、SEIL/hsHRD3 の発現抑制により、滑膜細胞のシノビオリンタンパク質が減少したことを示す図である。

図 7 は、SEIL/hsHRD3 の発現抑制により、滑膜細胞のコラーゲン産生が抑制されたことを示す図である。

図 8 は、SEIL/hsHRD3 とシノビオリンが複合体を形成したことを示す図である。

図 9 は、SEL1L/hsHRD3 とシノビオリンが小胞体に共局在することを示す図である。

図 10 は、SEL1L/hsHRD3 の発現抑制により、滑膜細胞のインターロイキン-6 の産生が抑制されたことを示す図である。

5 図 11 は、SEL1L/hsHRD3、およびシノビオリンの発現抑制により、両タンパク質の発現が抑制されたことを示す図である。

図 12 A は、シノビオリンの非存在下では SEL1L/hsHRD3 は不安定であることを示す図である。

10 図 12 B は、シノビオリンの非存在下では SEL1L/hsHRD3 は不安定であることを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

15 本発明は、hsHRD3 の発現を抑制し、滑膜細胞の異常増殖やインターロイキン-6 の産生を抑制する物質を含む、リウマチ等の疾患の診断、治療に有効な医薬組成物に関する。

シノビオリンは酵母からヒトまで高度に保存されており、出芽酵母において詳細な解析が行われている。シノビオリンの出芽酵母オルソログである Hrd1p は、Hrd3p と機能的な複合体を形成し、小胞体における異常タンパク質の分解に関  
20 わることが見出されている。出芽酵母の hrd3 破壊株では Hrd1p の不安定化と減少が観察され、生理学的な基質の安定化と増加が報告されている。このことは、ヒト Hrd3p オルソログ (hsHRD3) もシノビオリンと同様に、滑膜組織の異常増殖に必須であり、新たな関節症の診断、および治療法の開発に有効であることを示している。

25 そこで、本発明において、まず出芽酵母 Hrd3p のアミノ酸配列を用いてホモロジー検索をした結果、SEL1L という既知の遺伝子が見出された。Hrd3p と SEL1L との間においてアミノ酸配列の相同性は 30%、類似性は 45%であり、いずれも高くはないが、特異的な繰り返し構造と膜貫通ドメインが保存されている。従って、SEL1L は Hrd3p のオルソログであると決定した (図 1)。次に 2 本鎖

RNA (siRNA) を用いて滑膜細胞を処理すると、hsHRD3 の発現を抑制できることを確認した (図 2)。この条件下においては、滑膜細胞の細胞増殖活性は顕著に減少していた (図 3)。また約 30%の細胞がアポトーシスを起こしていた (図 4、5)。

- 5 出芽酵母において Hrd3p は Hrd1p の安定化に必須である。そこでシノビオリンタンパク質をウェスタンブロットで検出したところ、シノビオリンタンパク質は、hsHRD3 抑制下において著しく減少していた (図 6)。また、シノビオリンの発現が抑制されると、コラーゲン産生量も減少する。そこで、細胞内のコラーゲン量を測定したところ、これもコントロールに比べて減少していた (図 7)。
- 10 さらに、hsHRD3 はシノビオリンと細胞内で複合体を形成し (図 8)、共に小胞体に局在している (図 9) ことが明らかとなった。なお、滑膜細胞の増殖に重要な役割を果たしているインターロイキン-6 も 63.2%まで減少していた (図 10)。また、細胞内にシノビオリンタンパク質が存在しないときは、hsHRD3 は著しく減少し (図 11)、非常に不安定であった (図 12A 及び図 12B)。
- 15 以上の結果は、hsHRD3 をターゲットとするアプローチは、RA をはじめとする関節炎、線維症、癌及び脳神経疾患の新たな診断及び治療法の開発に有効であることを示している。特に SEL1L/hsHRD3 の発現や機能のコントロールを介して、シノビオリンの発現や機能を制御するという作用機序に基づいた薬剤の開発に有用である。

## 20 1. 滑膜細胞の増殖抑制

本発明において、「滑膜細胞」とは、リウマチ患者の関節部位において異常増殖している一連の細胞群を意味し、滑膜組織も包含する。

本発明において、「hsHRD3」とは、酵母のシノビオリンである Hrd1p と結合して機能的複合体を形成し、小胞体の異常なタンパク質の分解に携わっている

- 25 「Hrd3p」と呼ばれるタンパク質のヒトオルソログをいう。シノビオリンは、酵母からヒトまで高度に保存されており、特に出芽酵母において詳細な解析が行われている。この出芽酵母のオルソログである Hrd3p とアミノ酸のホモロジーが相同性で 30%、類似性で 45%であり、特異的な繰返し構造と膜貫通ドメインが保存されている SEL1L という遺伝子が見いだされ、これが後に hsHRD3 とさ



れた。この hsHRD3 は、配列番号 1 に示される塩基配列およびそのような配列と実質的に同一な塩基配列よりなる。実質的に同一な塩基配列とは、配列番号 1 からなる DNA に対し相補的な塩基配列よりなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ hsHRD3 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列をいう。「hsHRD3 活性」とは、小胞体において、異常なタンパク質を分解する活性をいう。このような、hsHRD3 をコードする DNA は、当業者に公知の方法で適当な断片を用いてプローブを作製し、このプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、cDNA ライブラリーおよびゲノムライブラリーから得ることができる。上記ハイブリダイゼーションにおいてストリンジェントな条件としては、たとえば、ハイブリダイゼーションにおいて洗浄時の塩濃度が 100~500mM、好ましくは 150~300mM であり、温度が 50~70℃、好ましくは 55~65℃の条件が挙げられる。

hsHRD3 のアミノ酸配列を配列番号 2 に、Hrd3p のアミノ酸配列を配列番号 3 に示す。

この hsHRD3 の発現を抑制すると、滑膜細胞の増殖活性が著しく抑制される。滑膜細胞とは、通常の関節構成要素となる細胞であって、関節腔の内側の層を満たす滑液を産生する細胞である。

シノビオリン遺伝子の発現を抑制するには、hsHRD3 の発現を抑制する方法が採用される。hsHRD3 の発現を抑制するには、RNAi という現象を利用することができるが、遺伝子工学技術を用いた部位特異的突然変異誘発法、アンチセンスヌクレオチド、リボザイムを用いてもよい。

RNAi とは、dsRNA(double-strand RNA)が標的遺伝子に特異的かつ選択的に結合し、当該標的遺伝子を切断することによりその発現を効率よく阻害する現象である。例えば、dsRNA を細胞内に導入すると、その RNA と相同配列の遺伝子の発現が抑制（ノックダウン）される。

上記 RNAi を起こさせるために、例えばシノビオリン遺伝子に対する siRNA 又は shRNA を設計及び合成し、これを作用させればよい。あるいは、hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制しても、シノビオリンの発現を抑制することが

できる。

siRNA の設計基準は、以下の通りである。

(a) シノビオリンをコードする遺伝子の開始コドンから 100 ヌクレオチド下流の領域を選択する。

- 5 (b) 選択した領域から、AA で始まる連続する 15～30 塩基、好ましくは 19 塩基の配列を探し、その配列の GC 含量が 30～70%、好ましくは 35～45% となるものを選択する。

具体的には、以下の塩基配列を有するものを siRNA として使用することができる。

10 センス鎖 : CUUGAUAUGGACCAGCUUUTT (配列番号 4)

アンチセンス鎖 : AAAGCUGGUCCAUAUCAAGTT (配列番号 5)

siRNA を滑膜細胞に導入するには、in vitro で合成した siRNA をプラスミド DNA に連結してこれを細胞に導入する方法、2 本鎖 RNA をアニールする方法などを採用することができる。

- 15 このように siRNA で滑膜細胞を処理して、hsHRD3 の発現を抑制する。

また、本発明は、RNAi 効果をもたらすために shRNA を使用することもできる。shRNA とは、ショートヘアピン RNA と呼ばれ、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有する RNA 分子である。

- shRNA は、その一部がステムループ構造を形成するように設計することができる。例えば、ある領域の配列を配列 A とし、配列 A に対する相補鎖を配列 B とすると、配列 A、スペーサー、配列 B の順でこれらの配列が一本の RNA 鎖に存在するように連結し、全体で 45～60 塩基の長さとなるように設計する。配列 A は、標的となる hsHRD3 遺伝子 (配列番号 1) の一部の領域の配列であり、  
20 標的領域は特に限定されるものではなく、任意の領域を候補にすることが可能である。そして配列 A の長さは 19～25 塩基、好ましくは 19～21 塩基である。

25 滑膜細胞の増殖を測定する方法は、培養液中に alamarBlue を適当量添加し、数時間後の 540nm を励起波長としたときの 590nm の蛍光強度を測定すればよい。

さらに、シノビオリン遺伝子又は hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制

するために、部位特異的突然変異誘発法等を使用することができる。部位特異的突然変異誘発法は当分野において周知であり、市販のキット、例えば GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System（インビトロジェン社製）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等（タカラバイオ社製））を使用することができる。

本発明は、hsHRD3 とシノビオリンが結合して形成された、小胞体に局在する複合体の形成を阻害することにより、シノビオリンの発現を抑制する方法を提供する。

hsHRD3 とシノビオリンとが結合して複合体を形成すると、シノビオリンの発現が上昇する。この場合、hsHRD3 とシノビオリンの複合体は小胞体に局在する。小胞体内腔における生合成途中のタンパク質は不安定であるため、種々の物理化学的ストレス（例えば虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異等）に曝される。このようなストレスを小胞体ストレス（ER ストレス）といい、小胞体内に異常な折りたたみ構造を持つタンパク質（unfolded protein）の出現頻度を上昇させる。適切な高次構造がとれずに立体構造に異常をきたした不良又は損傷タンパク質は小胞体を出てゴルジ体に輸送されないため、そのままでは小胞体内に不良タンパク質等が蓄積されてしまう。そこで、これらの ER ストレスに対して、細胞は UPR(Unfolded Protein Response) 及び ERAD(Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation)と呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって、不良タンパク質等を分解し、そのような不良タンパク質が蓄積することによる小胞体のストレスを防ぐことにより、小胞体の品質管理を行い、細胞機能の恒常性を保持している。出芽酵母の hrd3 破壊株においては、Hrd1p タンパク質が不安定かつ減少しており、基質が生理学的に安定化かつ増加していることが観察されているため、ヒトにおいても、シノビオリンと複合体を形成している hsHRD3 がこの品質管理機能に何らかの関与をしていると考えられる。

つまり、hsHRD3 の発現が抑制されると、シノビオリンと結合する hsHRD3 が減少し、その結果シノビオリンの発現も抑制されるのである。

また、シノビオリンの発現が増加すると、ERAD が亢進されることにより、

ER ストレスによるアポトーシスの感受性が低下し、反対に、シノビオリンの発現が抑制されると、アポトーシスの感受性が増加する。したがって、hsHRD3 の発現が抑制されると、シノビオリンの機能も低下し、結果としてアポトーシスが亢進する。

- 5      一方、コラーゲンについては、シノビオリンは P4HA1 というコラーゲン合成に必須のタンパク質のユビキチン化を通じて、その酵素としての品質を保つことにより、コラーゲン合成に必須の働きをしている。シノビオリンの発現が抑制されると P4HA1 の酵素活性が低下し、コラーゲン合成が低下する。したがって hsHRD3 の発現が抑制されると、シノビオリンの機能も低下し、結果としてコ
- 10      ラーゲン合成が低下する。

- したがって、hsHRD3 もシノビオリンと同様に、滑膜組織の異常増殖に必須であり、hsHRD3 の発現を抑制することにより、滑膜細胞の増殖を抑制すること、滑膜細胞、癌細胞、白血病又は悪性腫瘍のアポトーシスを誘起させること、及び、滑膜細胞、肺の繊維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制すること
- 15      ができるため、新たなリウマチ、線維症、関節症、癌および脳神経疾患の診断、および治療法を開発することができる。

上記の滑膜細胞の増殖を抑制するシノビオリンの発現阻害物質は、インターロイキン-6 の産生を抑制する物質でもある。

- インターロイキン-6 は B リンパ球の増殖分化のみならず、広く免疫応答、造血反応、炎症反応、及び神経系の細胞の増殖・分化、あるいは機能発現に重要な役割をしている多機能を有する典型的なサイトカインである。その作用は、骨髓における血小板の誘導、免疫系細胞の炎症部位への誘導、白血球のアポトーシスへの抵抗性の寄与、VEGF の誘導を介した血管の誘導、B 細胞の抗体産生細胞への分化、肝臓における C-反応性タンパク質産生量の増加などがある。インター
- 20      ーロイキン-6 は、通常免疫系の細胞により産生されるが、リウマチ滑膜細胞、白血病、骨髓腫など様々な増殖性疾患を引き起こす細胞からも産生され、それらの増殖に必須である。インターロイキン-6 が関与する疾患として、リウマチ、多発骨髓腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、骨粗しょう症などがある。また、慢性炎症性増殖性疾患に
- 25

においては、インターロイキン-6 が病態を形成するのに重要な役割を演じていることが知られており、インターロイキン-6 遺伝子の異常発現によりリウマチ等の自己免疫疾患や、血液中の細胞ががん化して起こる多発性骨髄腫及び白血病等の形質細胞腫の発症が誘導されることが明らかになっている。例えば、リウマチ患者関節液中ではインターロイキン-6 が著増していること、形質細胞腫/多発性骨髄腫の増殖因子がインターロイキン-6 そのものであること、インターロイキン-6 が、骨髄性白血病細胞に作用し、増殖を抑制するとともに、マクロファージへの分化を誘導することなどである。

従って、滑膜細胞、がん細胞、白血病細胞、骨肉種細胞、悪性腫瘍細胞、免疫系細胞及び破骨細胞において、インターロイキン-6 の産生を抑制することにより、これらのリウマチ等の自己免疫疾患や、血液中の細胞ががん化して起こる多発性骨髄腫、又は、白血病等の発症を抑制することができる。

インターロイキン-6 の産生を抑制するには、上記の滑膜細胞の増殖を抑制するシノビオリンの発現阻害物質を用いることができる。具体的には、hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である、hsHRD3 をコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA などを用いることができる。

## 2. 医薬組成物

### (1) 滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物

本発明の医薬組成物の適用疾患としては、リウマチ、線維症、関節炎、癌などの細胞増殖性疾患及び脳神経疾患などが挙げられ、単独でも複数の疾患が併発していても適用の対象となる。

本発明の医薬組成物を癌の治療剤として使用する場合は、適用部位は特に限定されず、脳腫瘍、舌癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆道癌、胆嚢癌、十二指腸癌、大腸癌、肝癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、皮膚癌、各種白血病（例えば急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、成人型 T 細胞白血病、悪性リンパ腫）等を対象として適用される。

上記癌は、原発巣であっても、転移したものであっても、他の疾患と併発した

ものであってもよい。

脳神経系疾患としては、例えばアルツハイマー、パーキンソン病、ポリグルタミン病が挙げられる。

(2) インターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物

- 5 本発明の医薬組成物の適用疾患としては、リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、骨粗しょう症などが挙げられる。

- 10 また、インターロイキン6は炎症に伴う多くの症状（痛み、発熱など）を引き起こすサイトカインでもある。したがって、本発明の医薬組成物は、炎症反応を抑制することもできる。炎症反応とは、生体に感染や外傷、火傷あるいはアレルギーなどの刺激により起こる局所的な組織反応をいい、局所反応に伴う全身的な現象も含まれる。具体的には、発赤、発熱、疼痛、腫脹に機能障害を加えて、炎症の五徴という。これらは急性炎症の肉眼的特徴を示しているが、この現象は局所的な血管の変化、すなわち、血管の拡張、透過性の亢進、白血球の浸潤による
- 15 ものである。

- 本発明の滑膜組織の異常増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する物質を有効成分として含有する医薬組成物の投与形態は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。経口投与の場合は、液剤として、または適当な剤型により投与が可能である。非経口投与の場合は、経肺剤型（例えばネフライザーなどを用いたもの）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等
- 20 が挙げられる。注射剤型の場合は、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。

- 本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随
- 25 伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その

小胞体を投与することも可能である。本発明の医薬組成物を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等から全身投与する。脳等に局所投与することもできる。本発明の医薬組成物を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。

5 本発明の医薬組成物は、常法にしたがって製剤化することができ、医薬的に許容される担体や添加物を含むものであってもよい。このような担体及び添加物として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロース、  
10 スナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マン  
15 ニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

上記添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせられて選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された滑膜組織の異常増殖を抑制する物質を溶剤（例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等）に溶解し、これに Tween 80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン  
20 等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤  
25 型によって異なる。投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択する。有効投与量は、一回につき体重 1kg あたり 0.1  $\mu$ g~100mg、好ましくは 1~10  $\mu$ g である。但し、上記治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。アデノウイルスの場合の投与量は 1 日 1 回あたり  $10^6$ ~ $10^{13}$  個程度であり、1~8 週間隔で投与される。但し、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるもので

はない。siRNA を混合する場合の用量は、0.01～10  $\mu$ g/ml、好ましくは 0.1～1  $\mu$ g/ml である。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

5

#### 〔実施例 1〕

出芽酵母 Hrd3p を用いたホモロジー検索

出芽酵母 Hrd3p/Ylr207wp のアミノ酸配列を用いてホモロジーサーチを実行した。

- 10     その結果、酵母 Hrd3p のヒトオルソログである配列番号 1 に示す塩基配列によりコードされるアミノ酸配列に相当するタンパク質を同定し、SEL1L 遺伝子が見出された。Hrd3p のアミノ酸配列を配列番号 3 に示す。Hrd3p と SEL1L との間においてアミノ酸配列の相同性は 30%、類似性は 45%であり、いずれも高くはないが、特異的な繰り返し構造と膜貫通ドメインが保存されている。従っ  
15     て、SEL1L は Hrd3p のオルソログであると決定した(図 1)。

#### 〔実施例 2〕

SEL1L/hsHRD3 の発現抑制の検討

- (1)RA 滑膜細胞を各遺伝子に対する 2 本鎖 RNA(siRNA)でトランスフェクションし、96 時間後に細胞を回収した。RNA を抽出し RT-PCR で各遺伝子の発現  
20     量を定量した。

- すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を 6cm ディッシュ 1 枚に付き、 $1 \times 10^4$  個の細胞を播いた。3 種類の RNAi 用オリゴと RNA オリゴ無し(ネガティブコントロール)の各サンプルに付きディッシュ  
25     1 枚、合計 4 枚播いた。培地は 10%FBS(牛胎児血清)を含み、抗生物質を含まない DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046)を 3ml 用いた。24 時間後、血清も抗生物質も含まない DMEM 3ml で 1 回洗い、同じ DMEM を 1.6ml 加えた。

その後トランスフェクション試薬を添加した。トランスフェクション試薬は次



のように調整した。GFP、hsHRD3、シノビオリンを標的とした RNAi のために、下記配列に示した RNA オリゴ(配列番号 4～9)を最終濃度が 100  $\mu$ M になるように TE に溶かした。

hsHRD3 を標的とした siRNA のセンス鎖：CUUGAUAUGGACCAGCUUUTT

5 (配列番号 4)

hsHRD3 を標的とした siRNA のアンチセンス鎖：AAAGCUGGUCCAUAUCAA  
GTT (配列番号 5)

GFP を標的とした siRNA のセンス鎖：GGCUACGUCCAGGAGCGCATT (配列  
番号 6)

10 GFP を標的とした siRNA のアンチセンス鎖：UGCGCUCCUGGACGUAGCCT  
T (配列番号 7)

シノビオリンを標的とした siRNA のセンス鎖：GGUGUUCUUUGGGCAACU  
GAGTT (配列番号 8)

シノビオリンを標的とした siRNA のアンチセンス鎖：CUCAGUUGCCCAAAG  
15 AACACCTT (配列番号 9)

各遺伝子に対する RNA オリゴのセンス鎖とアンチセンス鎖を 20  $\mu$ M になるように混合した。90℃で 2 分間熱変性した後、37℃で 1 時間ゆっくり冷却することにより、両オリゴをアニーリングさせた。アニーリングした 20  $\mu$ M RNA  
20 オリゴ 10  $\mu$ l をオプティメン(Optimem)350  $\mu$ l と混合し A 液を作った。次に Oligofectamine™ Reagent(Invitrogen, Cat. No.12252-011)8  $\mu$ l をオプティメン 32  $\mu$ l と混合し B 液を作った。A 液と B 液を 5 分間インキュベート後、両者を混合し、さらに 15 分インキュベートした。この混合液 400  $\mu$ l を全量、培地を交換した各ディッシュに加えた。その 4 時間後、FBS を 200  $\mu$ l 添加した。

25 トランスフェクション試薬添加 96 時間後、細胞からフェノール抽出法で全 RNA を抽出し、RT-PCR に用いた。RT-PCR は SUPERSRIPT™ One-Step RT-PCT 100 Reactions(Invitrogen Cat. No.10928-042)を用いた。すなわち、2×RXN 混合物 50  $\mu$ l、RT/Platinum 2  $\mu$ l、DEPC 水 28  $\mu$ l、以下に示す増幅用プライマー 3.2  $\mu$ M 溶液の各セット 10  $\mu$ l×2、合計 100  $\mu$ l を混合し、10  $\mu$ l ずつ

PCR チューブに分注した。そして 1  $\mu$ l の RNA を RT-PCR 鋳型として添加して PCR 反応を開始した。

hsHRD3 増幅用オリゴマー(5'→3') : GGCTGAACAGGGCTATG (配列番号 10)

hsHRD3 増幅用オリゴマー(3'→5') : CCGCTCGAGTTACTGTGGTGGCTGCTG

5 CTC (配列番号 11)

シノビオリン増幅用オリゴマー(5'→3') : AGCTGGTGTTTGGCTTTGAG (配列番号 12)

シノビオリン増幅用オリゴマー(3'→5') : GGGTGGCCCCTGATCCGCAG (配列番号 13)

10 hGAPDH 増幅用オリゴマー(5'→3') : AGGTGAAGGTCTGGAGTCAACGGA (配列番号 14)

hGAPDH 増幅用オリゴマー(3'→5') : AGTCCTTCCACGATACCAAAGTTG (配列番号 15)

15 RNA オリゴ無しは 100、50、10ng、その他は 100ng の RNA を鋳型として用いた。サイクルは、cDNA 伸長反応として 50℃ 30 分 94℃ 2 分を 1 回、続けて PCR 増幅反応として 94℃ 30 秒、50℃ 30 秒、72℃ 1 分を 30 回行い、最後に 72℃ 5 分最終伸長反応を行った後 4℃ で保存した。この PCR 反応液に 2  $\mu$ l の 6 × サンプルバッファーを加え、全量を 0.8% アガロースで 100 ボルト 30 分泳動し UV イルミネーターで PCR 産物を検出した。

20 その結果、siRNA により、SEIL/hsHRD3 の発現が抑制された (図 2)。図 2 において、hsHRD3 の RNAi により PCR 産物の量が、10ng のオリゴ無し(ネガティブコントロール)と同じレベルに減少したことから、hsHRD3 の mRNA の発現レベルが 10% 以下に抑制されたことが分かった。またこのときシノビオリンの mRNA は 100ng のオリゴ無しや GFP RNAi と同レベルであったことから

25 ら hsHRD3 の発現抑制はシノビオリンの転写には影響を与えないことが分かった。

(2) RA 滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖 RNA (siRNA) でトランスフェクションし、48 時間後に alamarBlue™ を添加した。さらに 48 時間後に細胞増殖活性を測定した。

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を 96-ウェルプレート各ウェルに、160 個の細胞を播いた。培地は 10%FBS（牛胎児血清）を含み、抗生物質を含まない DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046)を 100  $\mu$ l 用いた。24 時間後、血清も抗生物質も含まない DMEM 100  $\mu$ l で 1 回洗い、同じ DMEM を 80  $\mu$ l 加えた。その後実施例 2 (1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬を 20  $\mu$ l ずつ、培地を交換した各ウェルに加えた。さらに 4 時間後、FBS を 10  $\mu$ l 添加した。トランスフェクション試薬添加 48 時間後に各ウェルに 10  $\mu$ l の alamarBlue™を添加した。48 時間 37℃でインキュベートした後、560nm で励起したときの 590nm の 5  
10 蛍光強度を測定した。

その結果、SEIL/hsHRD3 の発現抑制により、滑膜細胞の増殖活性が約 60% にまで抑制された（図 3）。

このことは、hsHRD3 はシノビオリン同様に RA 滑膜細胞の細胞増殖に重要であり、その発現抑制は細胞の増殖低下を引き起こすことを意味する。

15 (3) RA 滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖 RNA (siRNA) でトランスフェクションし 120 時間後に細胞を回収した。回収した細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、FACS で DNA 含量を測定した。

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を 6 cm ディッシュ 1 枚に、 $1 \times 10^4$  個の細胞を播いた。三種類の RNAi 用オリゴと RNA オリゴ無し（ネガティブコントロール）の各サンプルをそれぞれディッシュ 1 枚、合計 4 枚播いた。培地は 10% FBS（牛胎児血清）を含み、抗生物質を 20  
25 含まない DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046)を 3ml 用いた。24 時間後、血清も抗生物質も含まない DMEM 3ml で 1 回洗い、同じ DMEM を 1.6ml 加えた。その後実施例 2 (1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬 400  $\mu$ l を全量、培地を交換した各ディッシュに加えた。さらに 4 時間後、FBS を 200  $\mu$ l 添加した。

トランスフェクション試薬添加 120 時間後、全細胞を回収し、0.5ml の PBS(-)/0.2% TritonX-100 で可溶化した後、ナイロンメッシュを通して、細胞塊を取り除いた。1ml の 50  $\mu$ g/ml RNase/PBS(-)と 1ml の 100  $\mu$ g/ml のヨウ化プロピジ

ウム/PBS(-)を加え、混合した後、氷中に保存した。各細胞の蛍光量をFACSCalibur (BECTON DICKINSON)で計測し、CELLQuestで解析した。

- 5     その結果、図4に示すようにアポトーシスを起こしたと考えられるDNA含量2n以下の細胞群がhsHRD3のRNAiにより30%以上にまで増加した。またこの割合はシノビオリンに対するRNAiと同程度に高かった(図5)。このことは、hsHRD3はシノビオリン同様に滑膜細胞の増殖に必須の遺伝子であり、その発現抑制は高頻度のアポトーシスを引き起こすことを意味している。

### 〔実施例3〕

- 10   (1) SEL1L/hsHRD3の発現抑制下におけるウェスタンブロットを用いたシノビオリンの検出

RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA(siRNA)でトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。総抽出液を抽出しウェスタンブロットで各タンパク質を検出した。

- 15     すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を10cmディッシュ1枚に付き、 $9 \times 10^4$ 個の細胞を播いた。三種類のRNAi用オリゴとRNAオリゴ無し(ネガティブコントロール)の各サンプルに付きディッシュ1枚、合計4枚播いた。培地は10%FBS(牛胎児血清)を含み、抗生物質を含まないDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046)を10ml  
20   用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 10mlで1回洗い、同じDMEMを9ml加えた。その後実施例2(1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬の3倍量1.2mlを、培地を交換した各ディッシュに加えた。さらに4時間後、FBSを1ml添加した。

- 25     トランスフェクション試薬添加48時間後、全細胞を回収し、50 $\mu$ lの抽出バッファーIV(50mM Tris-HCl pH7.5、2mM EDTA、0.1% Triton X-100、1% NP-40、500mM NaCl、1mM PMSF、0.1% アプロティニン(Aprotinin)、0.5 $\mu$ g/ml ペプスタチンA(PepstatinA)、1 $\mu$ g/ml リューペプチン(Leupeptin))に再懸濁した後、氷中に30分置き、14000rpm、4 $^{\circ}$ C、30分遠心した。上清1 $\mu$ lをBio-Rad DC ProteinAssay Reagent (BIO-RAD、Cat. No.500-0116)を用いたタ

ンパク質濃度測定に用い、残り 45  $\mu$ l に 15  $\mu$ l の 4 $\times$ SDS バッファーを加え、100 $^{\circ}$ C で 5 分加熱した。10  $\mu$ g 相当の細胞抽出液を 7.5%アクリルアミドゲル 2 枚で泳動、分離し、ニトロセルロース膜 (OPTITRAN BA-S 85 REINFORCED NC、Schleicher & Schuell、Cat. No.10 439196) にブロット後、5%スキムミルクで 30 分ブロッキングした。

一次抗体として 1000 倍希釈した抗シノビオリンモノクローナル抗体 (10Da) または抗 CREB-1 抗体 (Santa Cruze、Cat. No.sc-58) で 30 分インキュベートした。抗シノビオリンモノクローナル抗体の二次抗体には 2000 倍希釈した HRP-結合抗-マウス IgG(Amersham Biosciences、Cat. No.NA931V)を、抗 CREB-1 抗体には 3000 倍希釈した HRP-結合抗-ウサギ IgG(Amersham Biosciences、Cat. No.NA931V)を使用し、30 分インキュベートした。検出は Home-made ECL(44  $\mu$ l の 90mM クマリン酸、100  $\mu$ l の 250mM ルミノール、6  $\mu$ l の過酸化水素水を 20ml の 100mM Tris pH8.5 で混合したもの)を使用した。

その結果、シノビオリントタンパク質は、SEL1L/hsHRD3 抑制下において著しく減少していた (図 6) 。すなわち、hsHRD3 の発現抑制はシノビオリントタンパク質の不安定化を引き起こすことが明らかになった。

#### (2)シノビオリンの発現抑制下におけるコラーゲン産生量の検討

RA 滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖 RNA (siRNA) でトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。総抽出液を調製し、細胞内のコラーゲン量を測定した。

すなわち、実施例 3 (1)と同様な方法でトランスフェクション、細胞抽出液を調製し、30  $\mu$ g 相当の抽出液を抽出バッファーIV で 100  $\mu$ l に調節した後、SIRCOL Collagen Assay Kit(QBS 社/フナコシ Cat. No. S1111)でコラーゲン量を測定した。

その結果、hsHRD3 をノックアウトした細胞はコントロール(GFP)に比べて、細胞内コラーゲン量が約 70%にまで減少していた (図 7) 。

すなわち、hsHRD3 はシノビオリントタンパク質の安定化を通じて、コラーゲンの産生を促進しており、hsHRD3 の発現を抑制することにより、シノビオリントタンパク質の量が減少し、コラーゲン産生量を低下させることができる。

## 〔実施例 4〕

SEL1L/hsHRD3 とシノビオリンの細胞内における複合体の形成

HEK293 細胞に SP-HA-hsHRD3B と FLAG-シノビオリンのプラスミドをトランスフェクションした。48 時間後に細胞を回収し、総抽出液を調整した。抗 FLAG 抗体(a)、または抗 HA 抗体(b)で免疫沈降し、それぞれの抗体でウェスタンブロットを行った。

すなわち、hsHRD3B のシグナルペプチド(SP)の直後、配列番号 1 に示されたアミノ酸配列の 26 番目と 27 番目との間に HA-タグが挿入されるように DNA 構築したプラスミド(SP-HA-hsHRD3B)を pcDNA3-ベクターにクローニングした。

$8 \times 10^5$  個の HEK293 細胞を 10cm ディッシュ 4 枚に播いた。24 時間後、以下の(c)~(f)の 4 種類の組み合わせのプラスミドをトランスフェクションした。

(c)  $10 \mu\text{g}$  の SP-HA-hsHRD3B/pcDNA3 と  $3 \mu\text{g}$  の pCAGGS-ベクター

(d)  $10 \mu\text{g}$  の SP-HA-hsHRD3B/pcDNA3 と  $3 \mu\text{g}$  の FLAG-シノビオリン/pCAGGS

(e)  $10 \mu\text{g}$  の pcDNA3-ベクターと  $3 \mu\text{g}$  の FLAG-シノビオリン/pCAGGS

(f)  $10 \mu\text{g}$  の SP-HA-hsHRD3B/pcDNA3 と  $3 \mu\text{g}$  の FLAG-シノビオリン/pCAGGS.

トランスフェクション 48 時間後、細胞を回収し、 $200 \mu\text{l}$  の抽出バッファー II( $10 \text{ mM}$  Tris-HCl pH7.5、 $150 \text{ mM}$  NaCl、 $0.5\%$  NP-40、 $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $10\%$  glycerol、 $5 \text{ mM}$  EGTA、 $20 \text{ mM}$  NaF、 $50 \text{ mM}$   $\beta$ -グリセロフォスフェート (glycerophosphate)、 $1 \text{ mM}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、 $10 \text{ mM}$  NEM (N-エチルマレイミド)、 $1 \text{ mM}$  PMSF、 $1 \text{ mM}$  DTT、 $0.1\%$  アプロティニン、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  ペプスタチン A、 $1 \mu\text{g/ml}$  リューペプチン)に再懸濁し、氷上で 30 分インキュベートした後、 $14000\text{rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、30 分遠心した。タンパク質  $100 \mu\text{g}$  相当の抽出物を抽出バッファー II で  $1\text{ml}$  に調節した。このとき同時に牛血清アルブミンを最終濃度  $0.5\%$  になるように加えた。

次に、トランスフェクション(c)(d)由来の抽出物には 4.9mg の抗 FLAG 抗体 (M2、SIGMA、Cat. No. F3165)を、(e)(f)由来の抽出物には 2.4mg の抗 HA 抗体(12CA5、Roche、Cat. No.1 583 816)を加え、4℃で一晩浸透しながらインキュベートした。翌日、50%スラリーのプロテイン-G セファロースビーズを 60  $\mu$ l 加え、さらに 4℃で 1 時間インキュベートした。このビーズを 0.5ml の抽出バッファ- II で 2 回、0.5ml の抽出バッファ- II +150 mM NaCl(最終濃度 300mM NaCl)で 2 回洗い、30  $\mu$ l の 2 $\times$ SDS サンプルバッファ-を加え、100℃、5 分加熱することにより、吸着したタンパク質を溶出した。実施例 3(1)と同様の方法で SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行い、免疫沈降したタンパク質を検出した。

その結果、SEL1L/hsHRD3 はシノビオリンと細胞内で複合体を形成していることが判明した (図 8)。

#### (2)SEL1L/hsHRD3 とシノビオリンの細胞内における共局在

HEK293 細胞を SP-HA-hsHRD3B と FLAG-シノビオリンのプラスミドでトランスフェクションした。24 時間後に細胞を固定し、抗 HA 抗体と抗シノビオリンモノクローナル抗体で免疫染色した。

すなわち、2000 個の HEK293 細胞をチャンバースライドの各チャンバーに播いた。24 時間後、0.15  $\mu$ g の SP-HA-hsHRD3B/pcDNA3 と 0.05  $\mu$ g の FLAG-シノビオリンでトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 30 分固定し、3% BSA/PBS(-)で 1 晩ブロッキングした。翌日最終濃度が 1ng/ $\mu$ l になるように 0.3%BSA/PBS(-)で希釈した抗 HA 抗体 (3F10、Roche、Cat. No.1 867 431) と 100 倍希釈した抗シノビオリンモノクローナル抗体(10Da)で染色し、抗 HA 抗体は抗ラット Ig FITC 抗体 (DAKO、Cat.No.F0234)で、抗シノビオリン抗体は抗マウス Ig TRITC 抗体 (DAKO、Cat.No.R0270)で検出した。サンプルの観察、撮影は共焦点レーザースキャン顕微鏡 LSM510(Carl Zeiss Co.,Ltd.)で、画像解析は LSM510-v3.0 で行った。

その結果、SEL1L/hsHRD3 とシノビオリンは小胞体に共局在した (図 9)。  
図 9 において、左列は hsHRD3 の局在の図 (緑色)、中央列はシノビオリンの

局在の図（赤色）、右列は両者を重ね合わせた図（黄色）である。

これらの結果より、hsHRD3 はシノビオリンと小胞体において複合体を形成していることが判明した。

## 5      〔実施例 5〕

SEL1L/hsHRD3 の発現抑制下におけるインターロイキン-6 産生量の検討

(1) RA 滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖 RNA(siRNA)でトランスフェクションし、96 時間後に培地を新しいものに交換した。さらに 24 時間後に培地を回収し、その中に含まれるインターロイキン-6 の量を測定した。

- 10      すなわち、トランスフェクション前日に、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を 6cm ディッシュ 1 枚に付き、 $1 \times 10^4$  個の細胞を播いた。三種類の RNAi と RNA オリゴ無し(ネガティブコントロール)の各サンプルに付きディッシュ 1 枚、合計 4 枚播いた。培地は 10%FBS(牛胎児血清)を含み、抗生物質を含まない DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046)を 3ml 用いた。24
- 15      時間後、血清も抗生物質も含まない DMEM 3ml で 1 回洗い、同じ DMEM を 1.6ml 加えた。その後実施例 2 (1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬 400  $\mu$ l を全量、培地を交換した各ディッシュに加えた。さらに 4 時間後、FBS を 200  $\mu$ l 添加した。

- 20      トランスフェクション試薬添加 96 時間後、培地を新しいものに交換した。24 時間培養後、培地を回収し、14000rpm、30min、4℃で遠心した。その上清中に含まれるインターロイキン-6 タンパク質量を ELISA Kit(BIOSOURCE Immunoassay Kit for Human IL-6, Cat.# KHC0061)で測定した。同時に細胞も回収し、20  $\mu$ L の抽出バッファーIII(10 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM EDTA, 1% NONIDET P-40, 0.1% SDS, 200 mM NaCl 10 mM N-エチルマレイミド(NEM),
- 25      1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (phenylmethylsulfonylfluoride) (PMSF), 1 mM ジチオトレイトール, 0.1%アポロティニン, 0.5  $\mu$ g/ml ペプスタチン A, 1  $\mu$ g/ml リューペプチン)に溶かし氷上に 30 分置いた。14000rpm、30min、4℃で遠心した後、上清 1  $\mu$ l を Bio-Rad DC ProteinAssay Reagent (BIO-RAD、Cat. No. 500-0116) を用いたタンパク質濃度測定に用いて、総タン



パク質量を算出した。培地中のインターロイキン-6 タンパク質量をこの総タンパク質量で割った値をグラフ化した（図 10）。

その結果、SEL1L/hsHRD3 の発現抑制により、インターロイキン-6 タンパク質の産生量がコントロールに比べ、63.2%にまで減少した（図 10）。すなわち  
5 SEL1L/hsHRD3 はインターロイキン-6 の産生に必須な因子であることが明らかになった。

(2)上記(1)で調整した細胞総抽出液 45  $\mu$ l に 15  $\mu$ l の 4 $\times$ SDS バッファーを加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分加熱した。10  $\mu$ g 相当の細胞抽出液を 7.5%アクリルアミドゲルで泳動、分離し、ニトロセルロース膜(OPTITRAN BA-S 85 REINFORCED NC、  
10 Schleicher & Schuell, Cat. No. 10 439196)を用いてブロットした後、5%スキムミルクで 30 分ブロッキングした。

一次抗体として 1000 倍希釈した抗 SEL1L/hsHRD3 ペプチド抗体で 30 分インキュベートした。二次抗体には 10000 倍希釈した HRP-結合抗-ウサギ IgG (Amersham Biosciences, Cat. No. NA934V)を用いて 30 分インキュベートした。  
15 検出は ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences, Cat. No. RPN2132) を使用した。

検出後、再度ブロッキングし、一次抗体として 1000 倍希釈した抗シノビオリン抗体と 5000 倍希釈した抗  $\alpha$ -チューブリン抗体 (SIGMA Clone B-5-1-2) を用いて 30 分インキュベートした。二次抗体には 10000 倍希釈した HRP-結合抗-  
20 マウス IgG(Amersham Biosciences, Cat. No.NA931V)を用いて 30 分インキュベートした。検出は ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences, Cat. No.RPN2132)を使用した。

その結果、SEL1L/hsHRD3、およびシノビオリンの発現抑制により両タンパク質は発現が見られなくなった（図 11）。すなわち両タンパク質は相互に安定  
25 化しあっていることが判明した。

#### 〔実施例 6〕

SEL1L/hsHRD3 の安定性とシノビオリンとの複合体形成による影響

HEK293 細胞に SP-HA-hsHRD3B とベクター、または FLAG-シノビオリン

のプラスミドをトランスフェクションした。36 時間後にシクロヘキシミドを加えてチェイスアッセイを開始した。0、1、2、4、6 時間後に細胞を回収し、総抽出液を調整した。ウェスタンブロットで各タンパク質を検出、定量した。

すなわち、 $2 \times 10^5$  個の HEK293 細胞を 6-ウェルプレートに播いた。24 時間後、以下の(g)、(h)の 2 種類の組み合わせのプラスミドをトランスフェクションした。

(g)  $0.5 \mu\text{g}$  の SP-HA-hsHRD3B/pcDNA3 と  $0.25 \mu\text{g}$  の pcDNA3-ベクター

(h)  $0.5 \mu\text{g}$  の SP-HA-hsHRD3B/pcDNA3 と  $0.25 \mu\text{g}$  の FLAG-シノビオリン/pcDNA3

トランスフェクション 36 時間後、培地を新鮮なものに交換した。さらに 2 時間後、最終濃度が  $30 \mu\text{g/ml}$  になるようにシクロヘキシミドを添加した。0、1、2、4、6 時間後に細胞を回収し、 $50 \mu\text{l}$  の抽出バッファーIII (10 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM EDTA, 1% NONIDET P-40, 0.1% SDS, 200 mM NaCl 10 mM N-エチルマレイミド(NEM)、1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF), 1 mM ジチオトレイトール, 0.1%アプロティニン,  $0.5 \mu\text{g/ml}$  ペプスタチン A,  $1 \mu\text{g/ml}$  リューペプチン)に溶かし氷上に 30 分置いた。14000rpm、30min、 $4^\circ\text{C}$ で遠心した後、上清  $1 \mu\text{l}$  を Bio-Rad DC ProteinAssay Reagent (BIO-RAD、Cat. No. 500-0116)を用いたタンパク質濃度測定に用いた。残り  $45 \mu\text{l}$  に  $15 \mu\text{l}$  の  $4 \times \text{SDS}$  バッファーを加え、 $37^\circ\text{C}$ で 10 分加熱した。 $10 \mu\text{g}$  相当の細胞抽出液を 7.5%アクリルアミドゲルで泳動、分離し、ニトロセルロース膜 (OPTITRAN BA-S 85 REINFORCED NC、Schleicher & Schuell、Cat. No.10 439196) を用いてブロットした後、5%スキムミルクで 1 晩ブロッキングした。一次抗体として 10000 倍希釈した抗 HA 抗体 (3F10、Roche、Cat.No.1 867 431) で 30 分インキュベートし、10000 倍希釈した HRP-結合抗-ラット IgG で 30 分インキュベートした。検出は ECL plus Western blotting Detection System(Amersham Cat. No. RPN2132)を用いた。検出したバンドを ImageJ Software で定量した。正確な測定のために 0 時間目のサンプルを 2 倍、4 倍希釈したものを用いて標準曲線を作成し、それに基づいて両比を推定した。

その結果、SEL1L/hshRD3 はシノビオリンの非存在下では、半減期が 4.3 時

間から 1.8 時間と半分以下に短くなった（図 1 2 A、B）。すなわち SEL1L/hsHRD3 はシノビオリンと複合体を形成できないと、細胞内で不安定化することが判明した。

## 5 産業上の利用可能性

本発明により滑膜細胞（滑膜組織を含む）の異常増殖やインターロイキン-6 の産生を抑制する物質を含む医薬組成物が提供される。この物質は、滑膜組織又は滑膜細胞の異常増殖を抑制することができるため、リウマチ、線維症、関節症、癌及び脳神経疾患から選ばれる少なくとも 1 つ疾患の診断用又は治療用医薬組成物として有用である。

## 配列表フリーテキスト

配列番号 4 : DNA/RNA 結合分子

配列番号 5 : DNA/RNA 結合分子

15 配列番号 6 : DNA/RNA 結合分子

配列番号 7 : DNA/RNA 結合分子

配列番号 8 : DNA/RNA 結合分子

配列番号 9 : DNA/RNA 結合分子

配列番号 10 : 合成 DNA

20 配列番号 11 : 合成 DNA

配列番号 12 : 合成 DNA

配列番号 13 : 合成 DNA

配列番号 14 : 合成 DNA

配列番号 15 : 合成 DNA

25

## 請 求 の 範 囲

1. 滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物。
2. 滑膜細胞の増殖を抑制する物質が、シノビオリンの発現阻害物質である請求  
5 項 1 記載の医薬組成物。
3. シノビオリンの発現阻害物質が、hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である請求項 2 記載の医薬組成物。
4. hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質が、hsHRD3 をコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA である請求項 3 記載の医薬組成物。
- 10 5. hsHRD3 をコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)の DNA を含むものである請求項 3 又は 4 記載の医薬組成物。
  - (a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA
  - (b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ hsHRD3 活  
15 性を有するタンパク質をコードする DNA
6. siRNA が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 4 記載の医薬組成物。
7. リウマチ、線維症、関節炎、癌及び脳神経疾患から選ばれる少なくとも 1 つの疾患を診断又は治療するための請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組  
20 成物。
8. 滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することの特徴とする、滑膜細胞の増殖を抑制する方法。
9. 滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することの特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病又は悪性腫瘍のアポトーシスを誘起させる方法。
- 25 10. 滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することの特徴とする、滑膜細胞、肺の線維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制する方法。
11. 滑膜細胞の hsHRD3 の発現を抑制することの特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病細胞、骨肉種細胞、悪性腫瘍細胞、免疫系細胞及び破骨細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種の細胞からインターロイキン・6 の産生

を抑制する方法。

- 1 2. hsHRD3 の発現の抑制が、hsHRD3 とシノビオリンとの結合阻害によるものである、請求項 8 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 1 3. インターロイキン-6 の産生を抑制する物質を含む医薬組成物。
- 5 1 4. インターロイキン-6 の産生を抑制する物質がシノビオリンの発現阻害物質である請求項 1 3 記載の医薬組成物。
- 1 5. シノビオリンの発現阻害物質が、hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である請求項 1 4 記載の医薬組成物。
- 1 6. hsHRD3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質が、hsHRD3 をコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA である請求項 1 5 記載の医薬組成物。
- 10 1 7. hsHRD3 をコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)の DNA を含むものである請求項 1 5 又は 1 6 記載の医薬組成物。
  - (a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA
  - 15 (b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ hsHRD3 活性を有するタンパク質をコードする DNA
- 1 8. siRNA が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 1 6 記載の医薬組成物。
- 20 1 9. リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス及び骨粗しょう症からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの疾患を診断又は治療するための請求項 1 3 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- 2 0. 炎症反応を抑制することができる、請求項 1 3 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- 25

図1

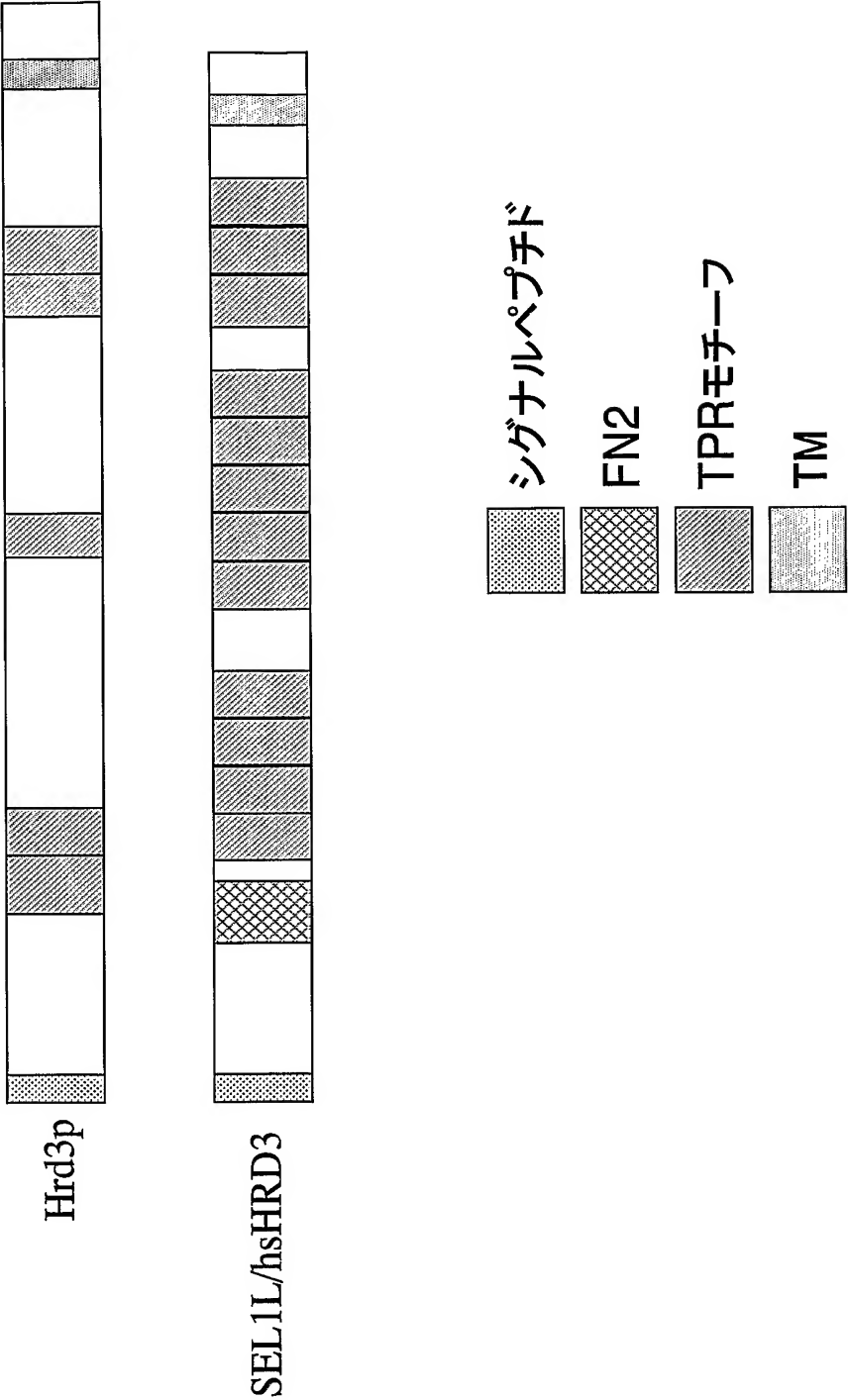




図3

細胞増殖活性

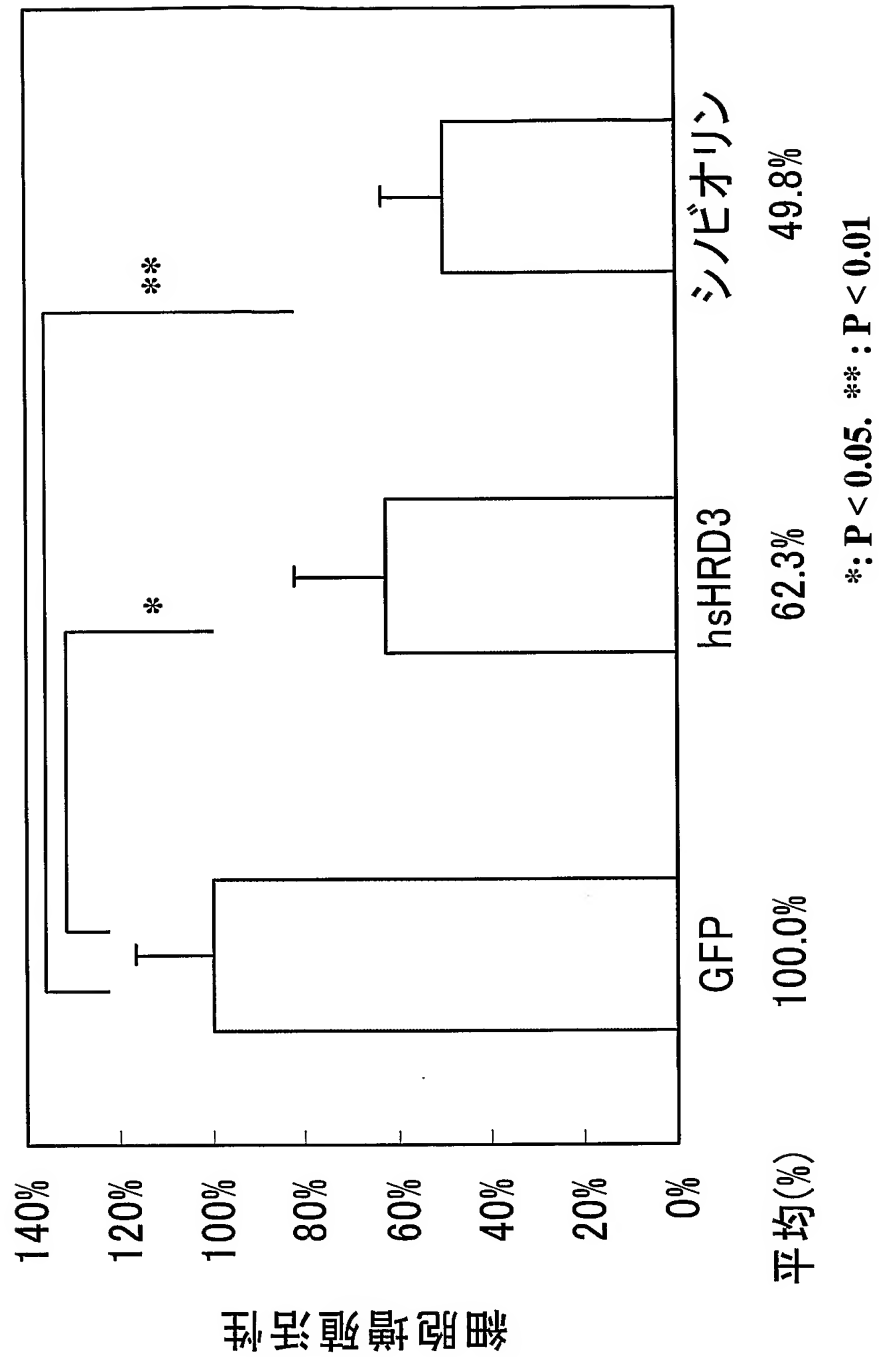
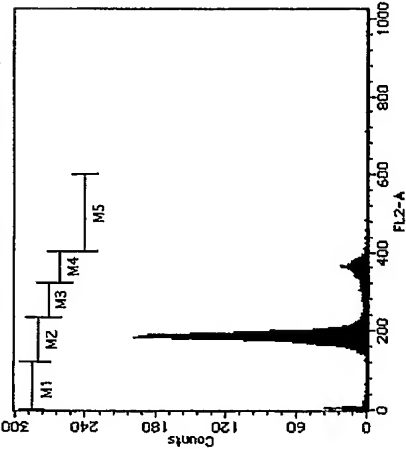


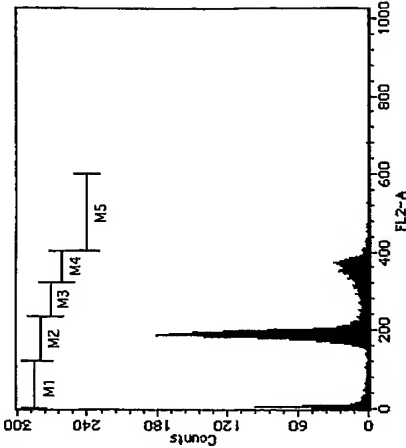


図4

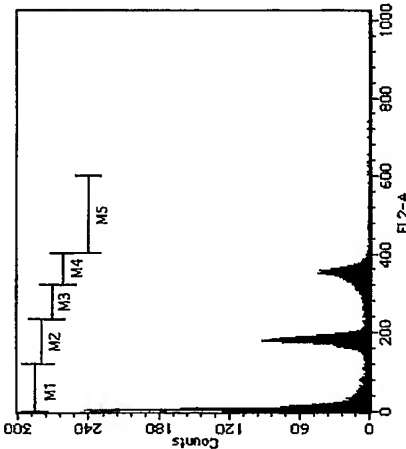
トランスフェクション試薬のみ  
(RNAオリゴ無し)



RNAi - GFP



RNAi - *hsHRD3*



RNAi - シンビオリン

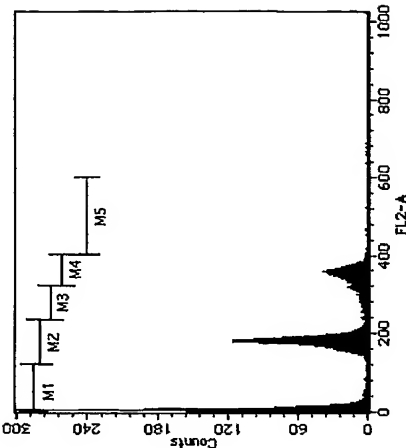


図5

## RNAiによるアポトーシス

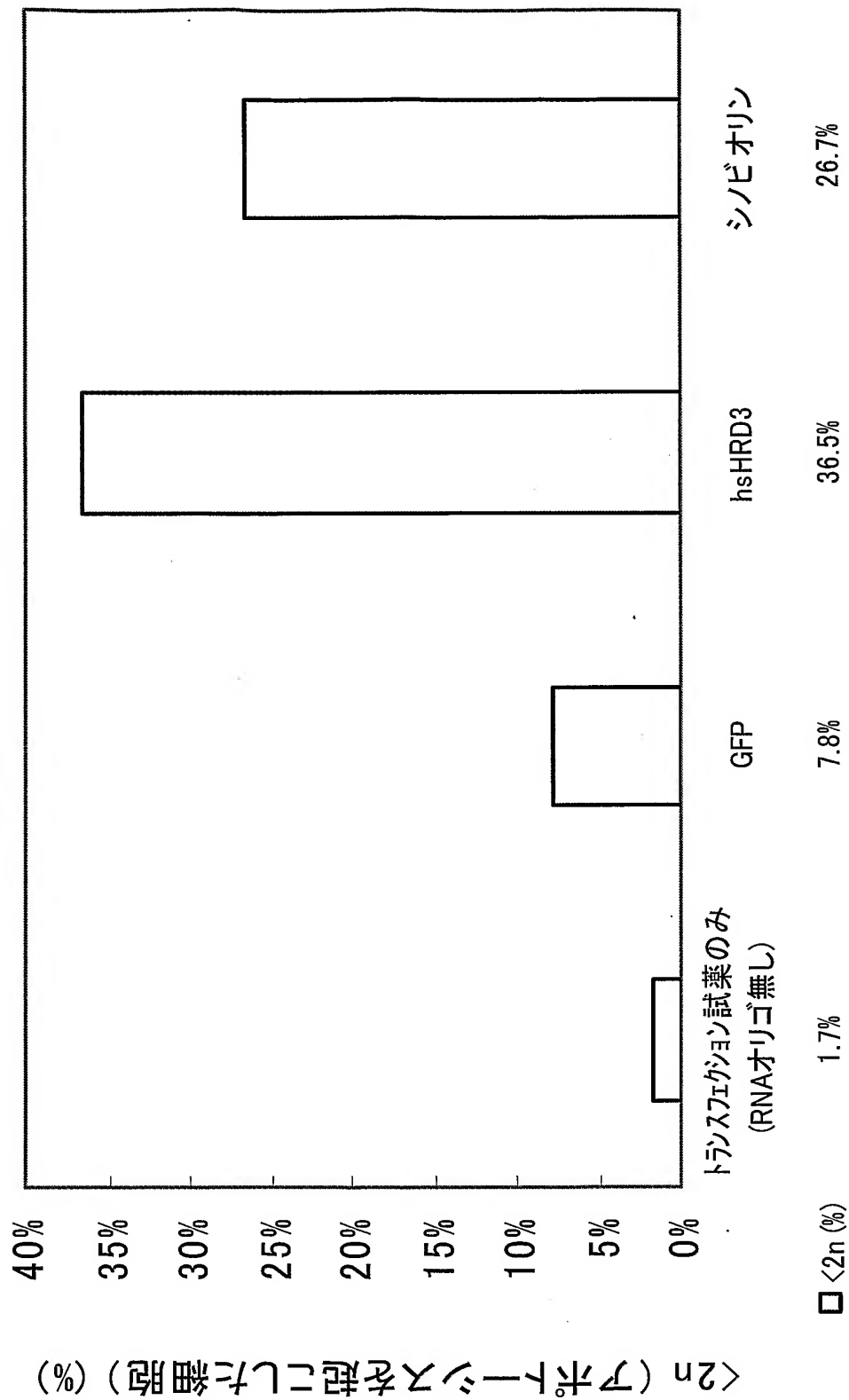


図6

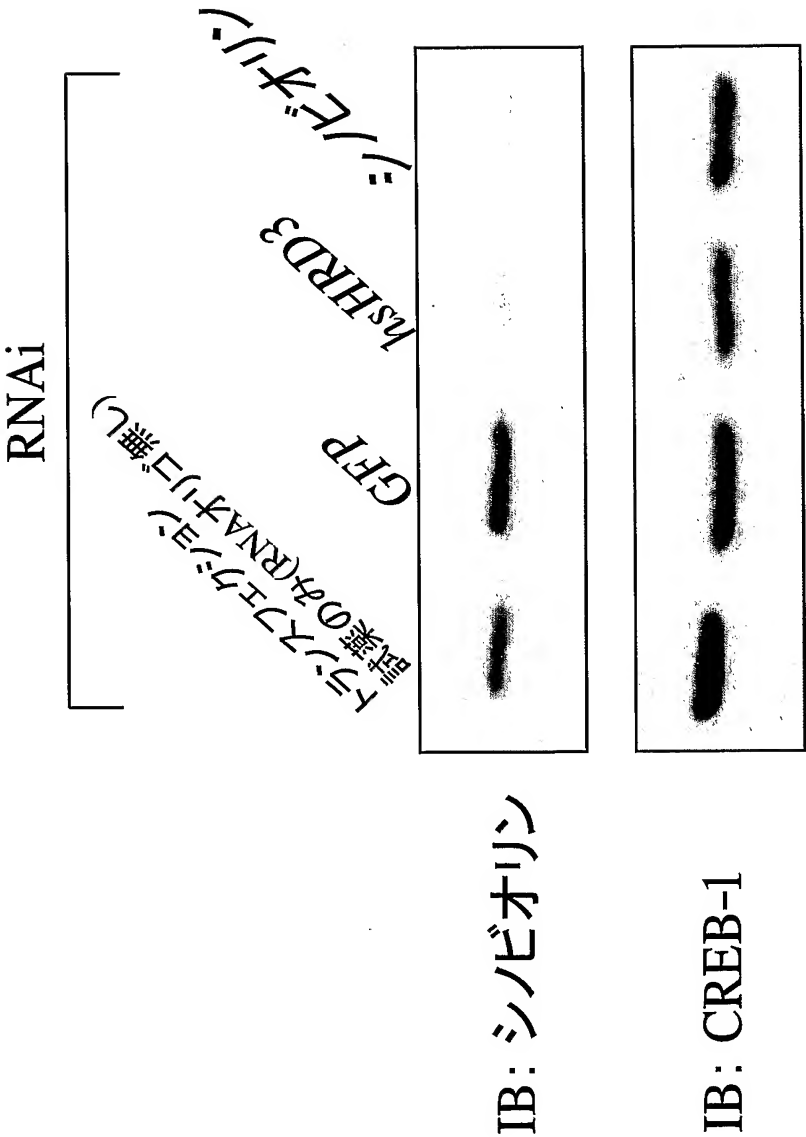


図7

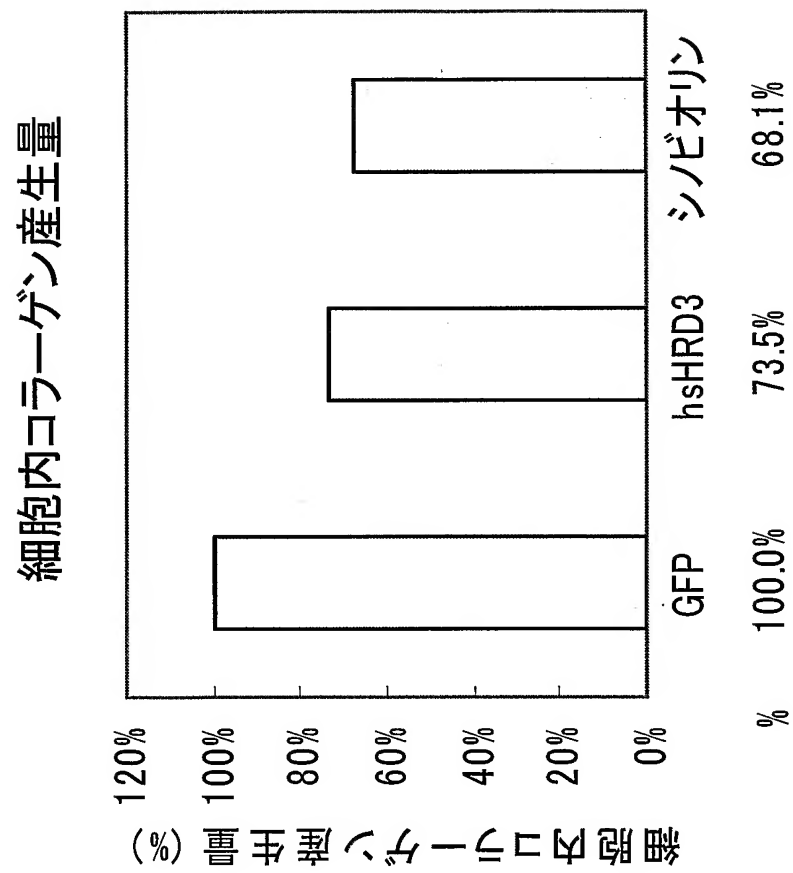
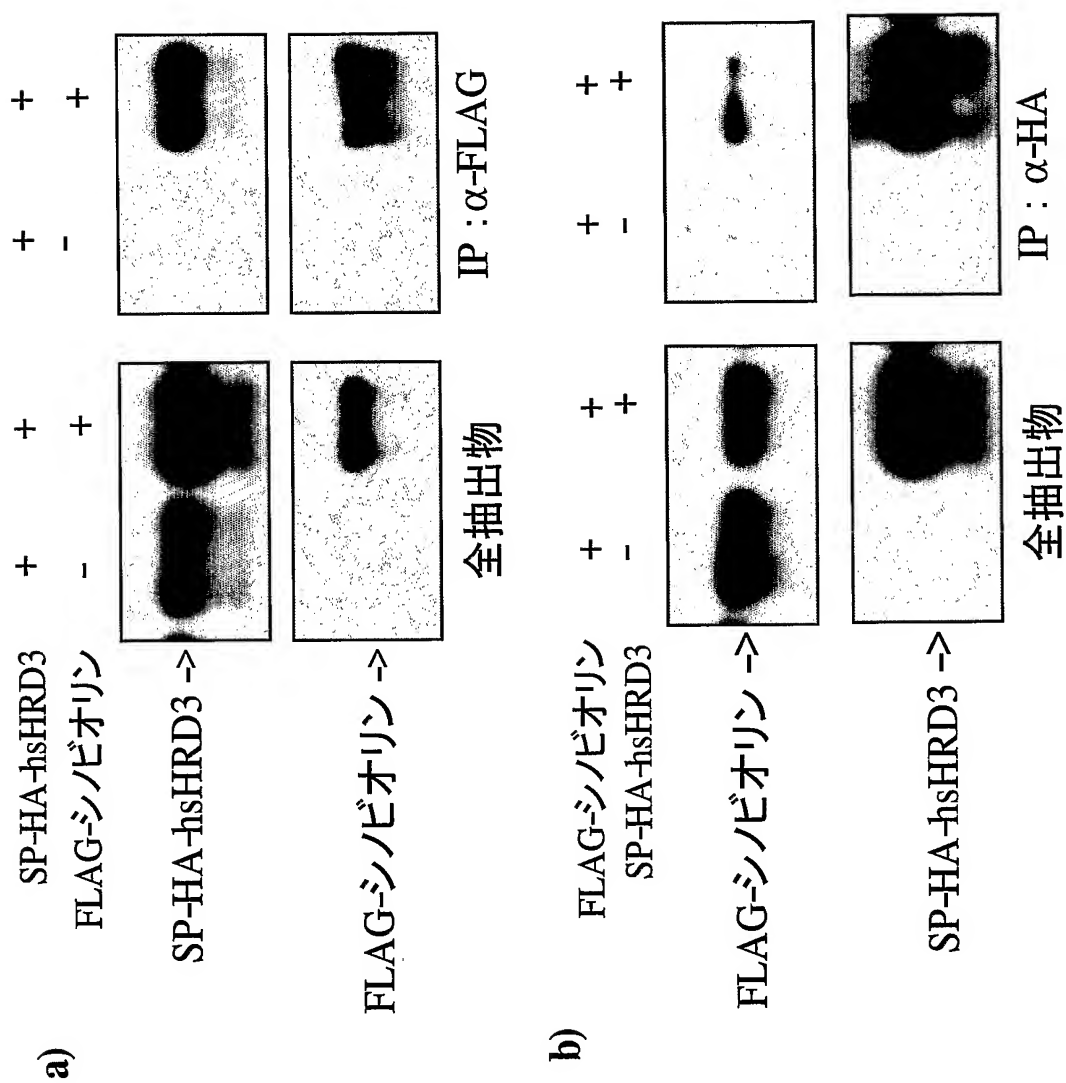


図8



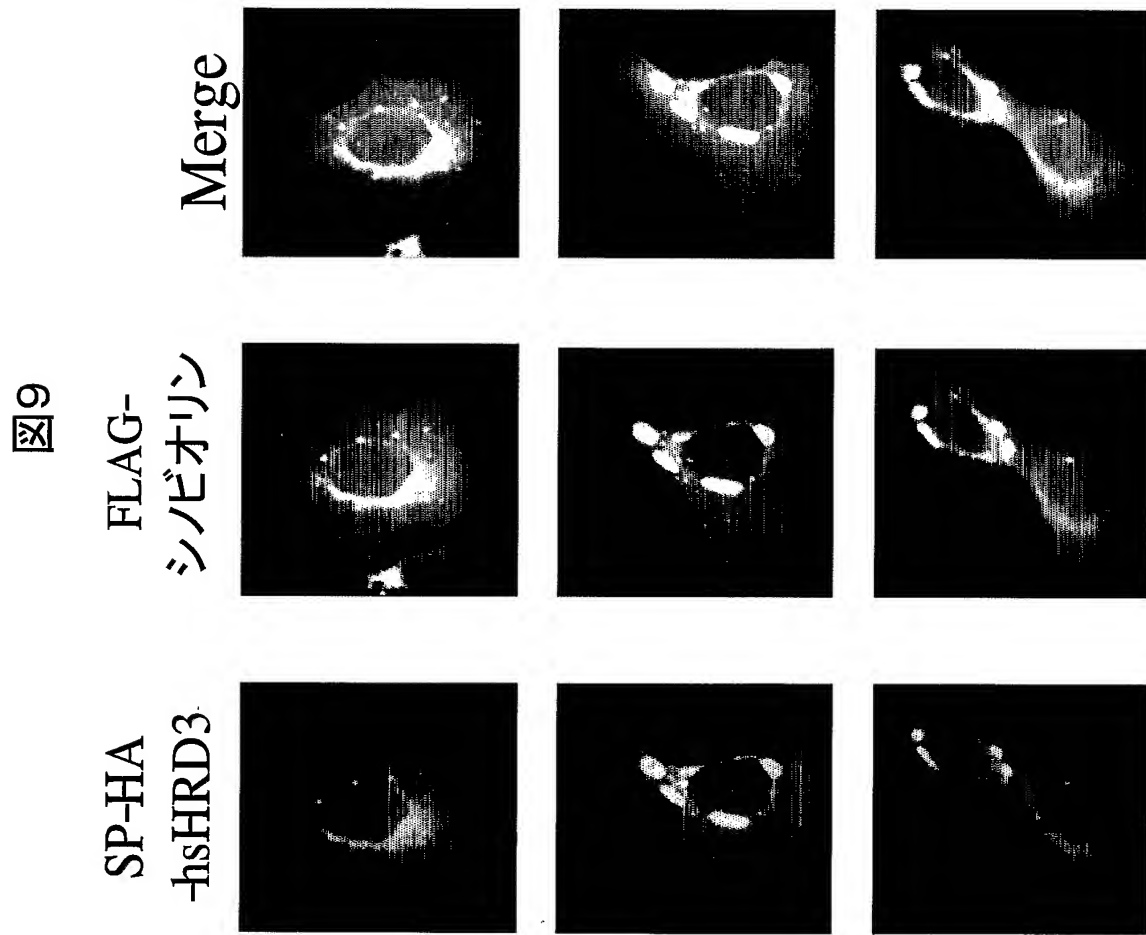


図10

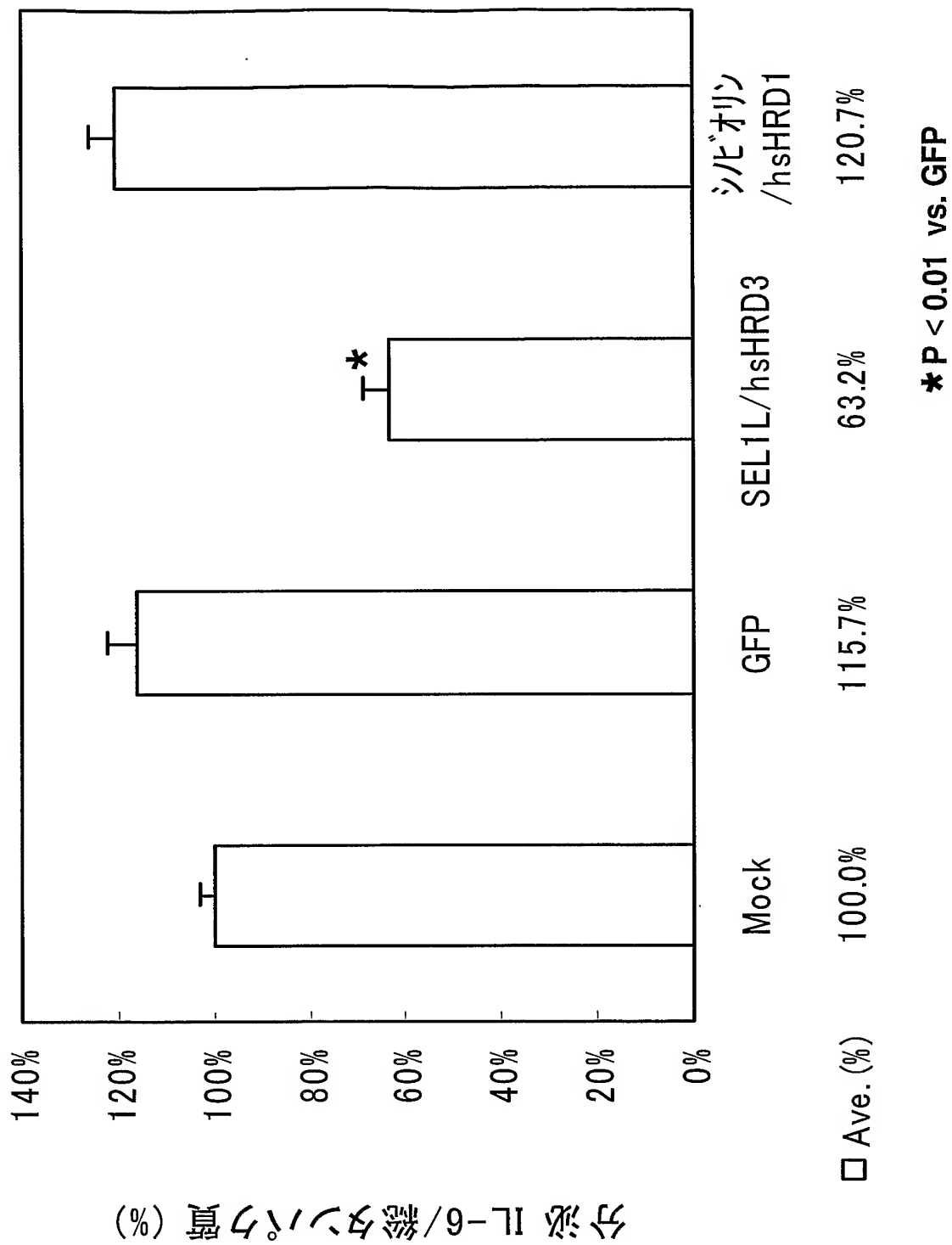


図11

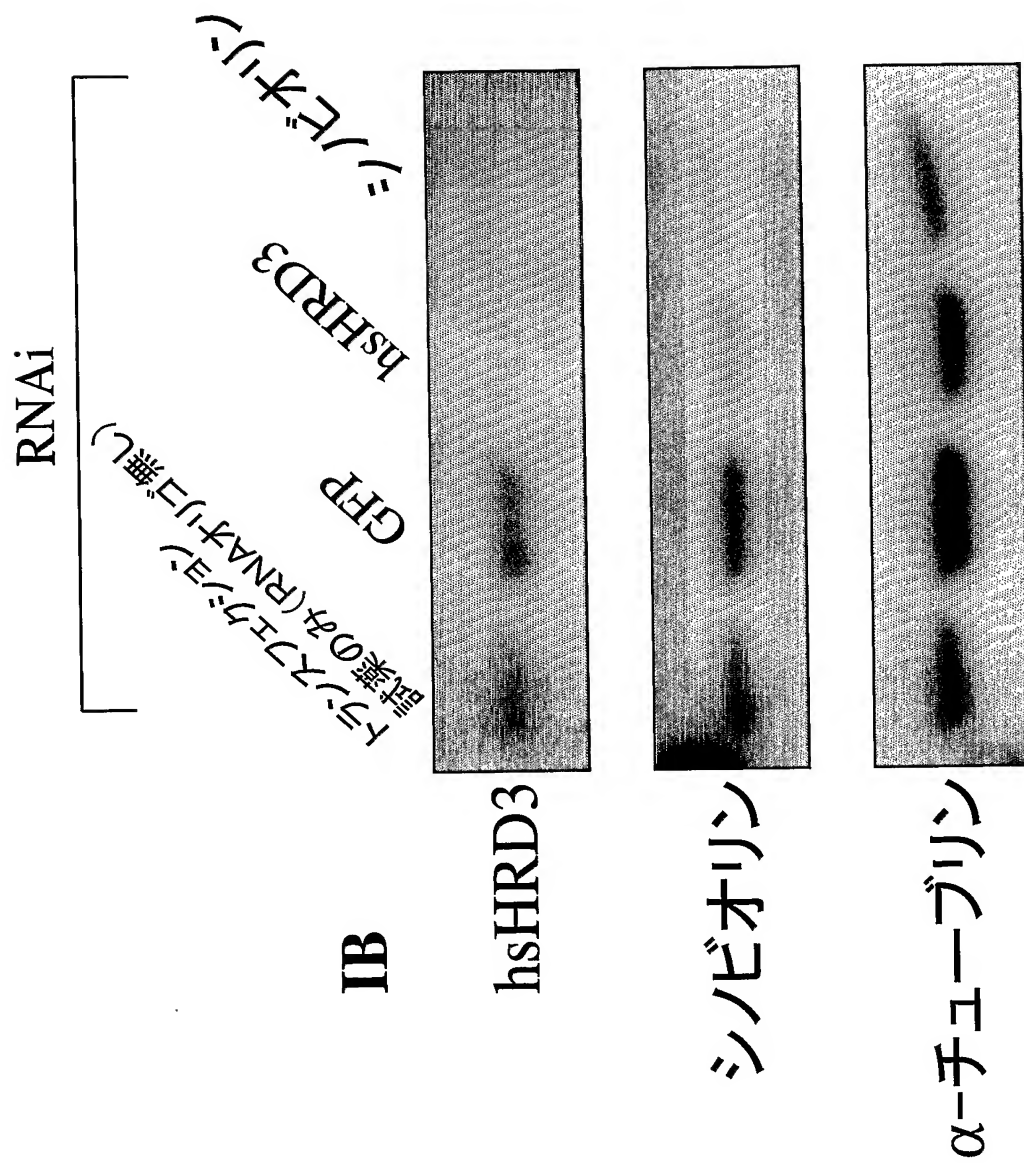




図12A

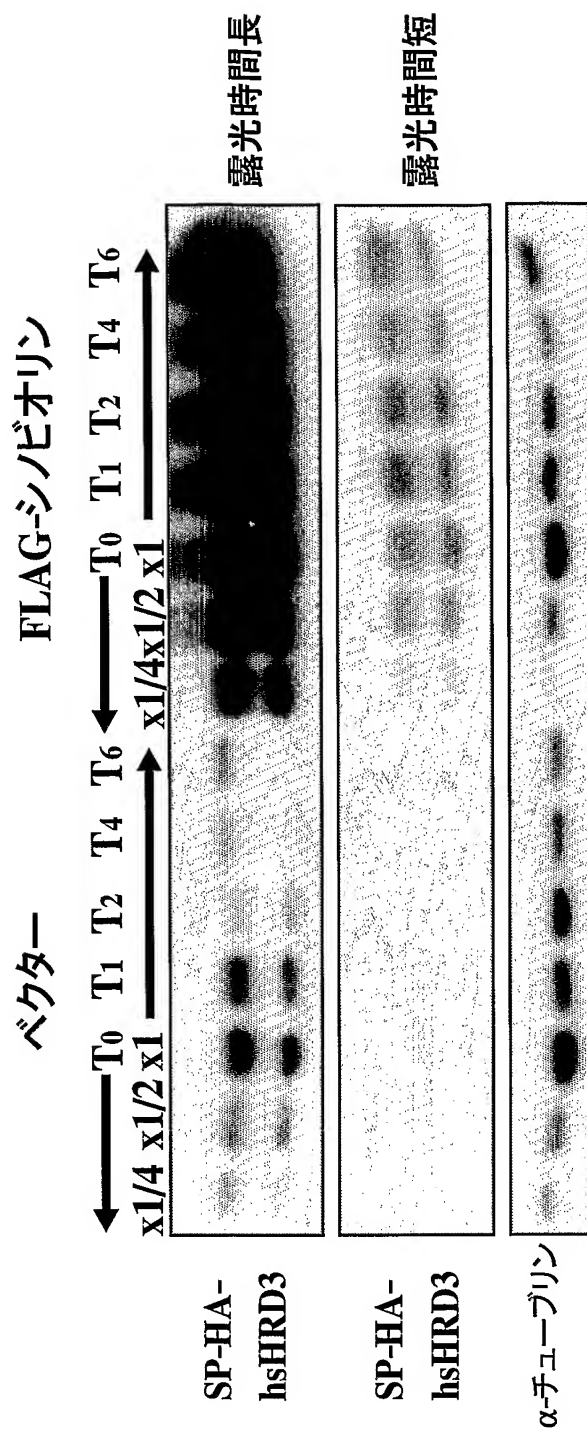
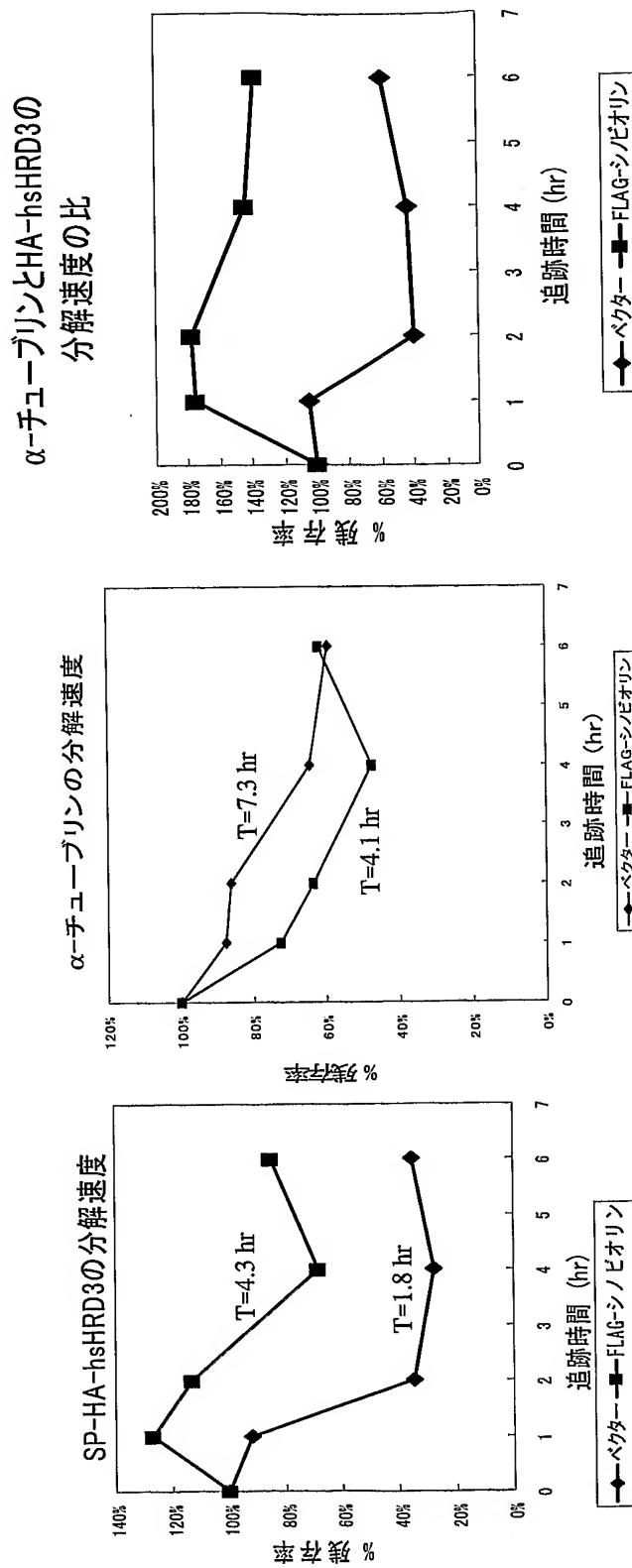


図12B



## SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> Pharmaceutical composition comprising hsHRD3

<130> PCT05-0016

<150> JP 2004-76931

<151> 2004-03-17

<150> JP 2004-314364

<151> 2004-10-28

<160> 15

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 7885

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (46).. (2427)

<400> 1

gcgaaggcga cagctctagg ggttggcacc ggccccgaga ggagg atg cgg gtc cgg 57  
Met Arg Val Arg  
1

ata ggg ctg acg ctg ctg ctg tgt gcg gtg ctg ctg agc ttg gcc tcg 105  
Ile Gly Leu Thr Leu Leu Leu Cys Ala Val Leu Leu Ser Leu Ala Ser  
5 10 15 20

gcg tcc tcg gat gaa gaa ggc agc cag gat gaa tcc tta gat tcc aag	153
Ala Ser Ser Asp Glu Glu Gly Ser Gln Asp Glu Ser Leu Asp Ser Lys	
25 30 35	
act act ttg aca tca gat gag tca gta aag gac cat act act gca ggc	201
Thr Thr Leu Thr Ser Asp Glu Ser Val Lys Asp His Thr Thr Ala Gly	
40 45 50	
aga gta gtt gct ggt caa ata ttt ctt gat tca gaa gaa tct gaa tta	249
Arg Val Val Ala Gly Gln Ile Phe Leu Asp Ser Glu Glu Ser Glu Leu	
55 60 65	
gaa tcc tct att caa gaa gag gaa gac agc ctc aag agc caa gag ggg	297
Glu Ser Ser Ile Gln Glu Glu Glu Asp Ser Leu Lys Ser Gln Glu Gly	
70 75 80	
gaa agt gtc aca gaa gat atc agc ttt cta gag tct cca aat cca gaa	345
Glu Ser Val Thr Glu Asp Ile Ser Phe Leu Glu Ser Pro Asn Pro Glu	
85 90 95 100	
aac aag gac tat gaa gag cca aag aaa gta cgg aaa cca gct ttg acc	393
Asn Lys Asp Tyr Glu Glu Pro Lys Lys Val Arg Lys Pro Ala Leu Thr	
105 110 115	
gcc att gaa ggc aca gca cat ggg gag ccc tgc cac ttc cct ttt ctt	441
Ala Ile Glu Gly Thr Ala His Gly Glu Pro Cys His Phe Pro Phe Leu	
120 125 130	
ttc cta gat aag gag tat gat gaa tgt aca tca gat ggg agg gaa gat	489
Phe Leu Asp Lys Glu Tyr Asp Glu Cys Thr Ser Asp Gly Arg Glu Asp	
135 140 145	
ggc aga ctg tgg tgt gct aca acc tat gac tac aaa gca gat gaa aag	537
Gly Arg Leu Trp Cys Ala Thr Thr Tyr Asp Tyr Lys Ala Asp Glu Lys	
150 155 160	

tgg ggc ttt tgt gaa act gaa gaa gag gct gct aag aga cgg cag atg	585
Trp Gly Phe Cys Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ala Lys Arg Arg Gln Met	
165                                      170                                      175                                      180	
cag gaa gca gaa atg atg tat caa act gga atg aaa atc ctt aat gga	633
Gln Glu Ala Glu Met Met Tyr Gln Thr Gly Met Lys Ile Leu Asn Gly	
185                                      190                                      195	
agc aat aag aaa agc caa aaa aga gaa gca tat cgg tat ctc caa aag	681
Ser Asn Lys Lys Ser Gln Lys Arg Glu Ala Tyr Arg Tyr Leu Gln Lys	
200                                      205                                      210	
gca gca agc atg aac cat acc aaa gcc ctg gag aga gtg tca tat gct	729
Ala Ala Ser Met Asn His Thr Lys Ala Leu Glu Arg Val Ser Tyr Ala	
215                                      220                                      225	
ctt tta ttt ggt gat tac ttg cca cag aat atc cag gca gcg aga gag	777
Leu Leu Phe Gly Asp Tyr Leu Pro Gln Asn Ile Gln Ala Ala Arg Glu	
230                                      235                                      240	
atg ttt gag aag ctg act gag gaa ggc tct ccc aag gga cag act gct	825
Met Phe Glu Lys Leu Thr Glu Glu Gly Ser Pro Lys Gly Gln Thr Ala	
245                                      250                                      255                                      260	
ctt ggc ttt ctg tat gcc tct gga ctt ggt gtt aat tca agt cag gca	873
Leu Gly Phe Leu Tyr Ala Ser Gly Leu Gly Val Asn Ser Ser Gln Ala	
265                                      270                                      275	
aag gct ctt gta tat tat aca ttt gga gct ctt ggg ggc aat cta ata	921
Lys Ala Leu Val Tyr Tyr Thr Phe Gly Ala Leu Gly Gly Asn Leu Ile	
280                                      285                                      290	
gcc cac atg gtt ttg ggt tac aga tac tgg gct ggc atc ggc gtc ctc	969
Ala His Met Val Leu Gly Tyr Arg Tyr Trp Ala Gly Ile Gly Val Leu	
295                                      300                                      305	

cag agt tgt gaa tct gcc ctg act cac tat cgt ctt gtt gcc aat cat	1017
Gln Ser Cys Glu Ser Ala Leu Thr His Tyr Arg Leu Val Ala Asn His	
310 315 320	
gtt gct agt gat atc tcg cta aca gga ggc tca gta gta cag aga ata	1065
Val Ala Ser Asp Ile Ser Leu Thr Gly Gly Ser Val Val Gln Arg Ile	
325 330 335 340	
cgg ctg cct gat gaa gtg gaa aat cca gga atg aac agt gga atg cta	1113
Arg Leu Pro Asp Glu Val Glu Asn Pro Gly Met Asn Ser Gly Met Leu	
345 350 355	
gaa gaa gat ttg att caa tat tac cag ttc cta gct gaa aaa ggt gat	1161
Glu Glu Asp Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln Phe Leu Ala Glu Lys Gly Asp	
360 365 370	
gta caa gca cag gtt ggt ctt gga caa ctg cac ctg cac gga ggg cgt	1209
Val Gln Ala Gln Val Gly Leu Gly Gln Leu His Leu His Gly Gly Arg	
375 380 385	
gga gta gaa cag aat cat cag aga gca ttt gac tac ttc aat tta gca	1257
Gly Val Glu Gln Asn His Gln Arg Ala Phe Asp Tyr Phe Asn Leu Ala	
390 395 400	
gca aat gct ggc aat tca cat gcc atg gcc ttt ttg gga aag atg tat	1305
Ala Asn Ala Gly Asn Ser His Ala Met Ala Phe Leu Gly Lys Met Tyr	
405 410 415 420	
tcg gaa gga agt gac att gta cct cag agt aat gag aca gct ctc cac	1353
Ser Glu Gly Ser Asp Ile Val Pro Gln Ser Asn Glu Thr Ala Leu His	
425 430 435	
tac ttt aag aaa gct gct gac atg ggc aac cca gtt gga cag agt ggg	1401
Tyr Phe Lys Lys Ala Ala Asp Met Gly Asn Pro Val Gly Gln Ser Gly	
440 445 450	

ctt gga atg gcc tac ctc tat ggg aga gga gtt caa gtt aat tat gat	1449
Leu Gly Met Ala Tyr Leu Tyr Gly Arg Gly Val Gln Val Asn Tyr Asp	
455 460 465	
cta gcc ctt aag tat ttc cag aaa gct gct gaa caa ggc tgg gtg gat	1497
Leu Ala Leu Lys Tyr Phe Gln Lys Ala Ala Glu Gln Gly Trp Val Asp	
470 475 480	
ggg cag cta cag ctt ggt tcc atg tac tat aat ggc att gga gtc aag	1545
Gly Gln Leu Gln Leu Gly Ser Met Tyr Tyr Asn Gly Ile Gly Val Lys	
485 490 495 500	
aga gat tat aaa cag gcc ttg aag tat ttt aat tta gct tct cag gga	1593
Arg Asp Tyr Lys Gln Ala Leu Lys Tyr Phe Asn Leu Ala Ser Gln Gly	
505 510 515	
ggc cat atc ttg gct ttc tat aac cta gct cag atg cat gcc agt ggc	1641
Gly His Ile Leu Ala Phe Tyr Asn Leu Ala Gln Met His Ala Ser Gly	
520 525 530	
acc ggc gtg atg cga tca tgt cac act gca gtg gag ttg ttt aag aat	1689
Thr Gly Val Met Arg Ser Cys His Thr Ala Val Glu Leu Phe Lys Asn	
535 540 545	
gta tgt gaa cga ggc cgt tgg tct gaa agg ctt atg act gcc tat aac	1737
Val Cys Glu Arg Gly Arg Trp Ser Glu Arg Leu Met Thr Ala Tyr Asn	
550 555 560	
agc tat aaa gat ggc gat tac aat gct gca gtg atc cag tac ctc ctc	1785
Ser Tyr Lys Asp Gly Asp Tyr Asn Ala Ala Val Ile Gln Tyr Leu Leu	
565 570 575 580	
ctg gct gaa cag ggc tat gaa gtg gca caa agc aat gca gcc ttt att	1833
Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Val Ala Gln Ser Asn Ala Ala Phe Ile	
585 590 595	

ctt gat cag aga gaa gca agc att gta ggt gag aat gaa act tat ccc	1881
Leu Asp Gln Arg Glu Ala Ser Ile Val Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Pro	
600 605 610	
aga gct ttg cta cat tgg aac agg gcc gcc tct caa ggc tat act gtg	1929
Arg Ala Leu Leu His Trp Asn Arg Ala Ala Ser Gln Gly Tyr Thr Val	
615 620 625	
gct aga att aag ctc gga gac tac cat ttc tat ggg ttt ggc acc gat	1977
Ala Arg Ile Lys Leu Gly Asp Tyr His Phe Tyr Gly Phe Gly Thr Asp	
630 635 640	
gta gat tat gaa act gca ttt att cat tac cgt ctg gct tct gag cag	2025
Val Asp Tyr Glu Thr Ala Phe Ile His Tyr Arg Leu Ala Ser Glu Gln	
645 650 655 660	
caa cac agt gca caa gct atg ttt aat ctg gga tat atg cat gag aaa	2073
Gln His Ser Ala Gln Ala Met Phe Asn Leu Gly Tyr Met His Glu Lys	
665 670 675	
gga ctg ggc att aaa cag gat att cac ctt gcg aaa cgt ttt tat gac	2121
Gly Leu Gly Ile Lys Gln Asp Ile His Leu Ala Lys Arg Phe Tyr Asp	
680 685 690	
atg gca gct gaa gcc agc cca gat gca caa gtt cca gtc ttc cta gcc	2169
Met Ala Ala Glu Ala Ser Pro Asp Ala Gln Val Pro Val Phe Leu Ala	
695 700 705	
ctc tgc aaa ttg ggc gtc gtc tat ttc ttg cag tac ata cgg gaa aca	2217
Leu Cys Lys Leu Gly Val Val Tyr Phe Leu Gln Tyr Ile Arg Glu Thr	
710 715 720	
aac att cga gat atg ttc acc caa ctt gat atg gac cag ctt ttg gga	2265
Asn Ile Arg Asp Met Phe Thr Gln Leu Asp Met Asp Gln Leu Leu Gly	
725 730 735 740	



cct gag tgg gac ctt tac ctc atg acc atc att gcg ctg ctg ttg gga	2313
Pro Glu Trp Asp Leu Tyr Leu Met Thr Ile Ile Ala Leu Leu Leu Gly	
745 750 755	
aca gtc ata gct tac agg caa agg cag cac caa gac atg cct gca ccc	2361
Thr Val Ile Ala Tyr Arg Gln Arg Gln His Gln Asp Met Pro Ala Pro	
760 765 770	
agg cct cca ggg cca cgg cca gct cca ccc cag cag gag ggg cca cca	2409
Arg Pro Pro Gly Pro Arg Pro Ala Pro Pro Gln Gln Glu Gly Pro Pro	
775 780 785	
gag cag cag cca cca cag taataggcac tgggtccagc ctigatcagt	2457
Glu Gln Gln Pro Pro Gln	
790	
gacagcgaag gaagttaatct gctgggaaca ctigcatttg atttaggacc ttggatcagt	2517
ggtcacctcc cagaagaggc acggcacaag gaagcattga attcctaaag ctgcttagaa	2577
tctgatgcct ttattttcag ggataagtaa ctcctaccta aacigagctg aatgtttgtt	2637
tcagtgccat atggagtaac aactttcagt ggcttttttt tttcttttct gaaacatat	2697
gtgagacact cagagtaatg tctactgtat ccagctatct ttttttggat ctttttggtc	2757
attatttcag tgtgcataag ttcttaatgt caaccatctt taaggatatg tgcacgaca	2817
ctaaaaactg atcagtgtta aaaaggaaaa cccagttgca agtttaaacg tgttcgaaag	2877
tctgaaaata gaactigcct ttttaagttaa aaaaaaaaaa aaagctatct tgaaaatgtt	2937
ttggaactgc gataactgag aaacttccta ccagtcacaa tgcaattaaa catattcagc	2997
atatttgtaa ttttaaaagg gagggttggg aggtttccta ttggtgattg tcacacggta	3057

taccatactc ctctccttca aagaatgaaa ggccttgta aggagttttt tgtgagcttt 3117  
acttcttttg aatggaatat acttatgcaa aaccttgta actgactcct tgcactaacg 3177  
cgagtttgcc ccacctactc tgtaatttgc ttgittgttt tgaatataac agagccttga 3237  
tccagaagcc agaggatgga ctaagtggga gaaattagaa aacaaaacga actctggttg 3297  
gggtactacg atcacagaca cagacatact ttccctaaag ttgaagcatt tgttcccagg 3357  
atttatitita ctttgcatit ctttttgcac aaagaacaca tcaccttcct gaattcttta 3417  
aataigaaat atcattgccg gggatggct tacagtgact actattatca atactaaaac 3477  
tcagagaatc aaagatggat taaactcagt ggttgatgaa agccaaaacc tgtttgtact 3537  
gttctatact attcaggtat ctttttatit ctgatagttt tatattataa tagaaagcca 3597  
gccactgctt agctatcata gtcaccatit tctactgtt aacattagga aaatcaaggc 3657  
tactatgctt caggattgtc tggtaaata gtatgggaaa aaaactgaag agtttcaaca 3717  
taattacaca cgtgaaataa ttacagctta aactgaatit gtatttcatt ttattgtcag 3777  
atgggtgtgt tcaccagcct gtatcttgtc tgagactgca ttcgtatctg agcaggtttt 3837  
ctaigcctac tgaigtcagt atgtttatac taaccticat gcttttttcc cagaatccct 3897  
catctgccag aaaacttgaa aagtttatit cttgtagagt tgtactgctt tgatttttga 3957  
agttggggtg gtagttagaa ctagatttaa ctagtctata atgaacatga aggcttttat 4017  
atatgaagtt gtatacctit ttgtgtttag agaattatgg gaaacctggg aagcaaaact 4077  
ttctctccag ataattgctt ccaaattcga agagttagtc accaagagag ccatatgtat 4137

gaaagcgtat ctgtgaaagg taggaaactt acccccccta agtgtaatgt tgcttttaggc 4197  
 aactcttgta aatagtgaga ctgttttggt ctctiacatg tagagatttg agtgcagttg 4257  
 gtacagtact ttggtgtctc caccactgtc cttctcccc gcttcaaaat aagtgtaatc 4317  
 cacggtagca gccacacttc cttcagaagg aactgttata atttatttaa aagttgaaaa 4377  
 accaccaag atgactacca actttcactt tttttcttct gccatccacc ctcatcttcc 4437  
 ctttagcaag atttttatat ctaactttcc ttccctccat tgagtacgtg ctttgagaaa 4497  
 acatttctta aaacagtgtg tgccacctaa ggctggatgg gaaagtgcag tcttgttgtt 4557  
 catataaaaa acacacttct tattagttaa cccacttgcc tttttctatt gttaaigtgc 4617  
 tgaatttctt tttcttggtt tgtttctact tcattttaac cctgggtcac ttgctgccag 4677  
 cagtttgtga atgggtgtctt tcaaataact tagttcttat ggcttcactt aaagactgtc 4737  
 tcaaaaatac ttgtctctct tcttcttttt tgttcatggg acatgggtacc taagcaaata 4797  
 ggagttgggt ttggtttttc tcctaaaata atgctcaata ctacctaata caaatggcat 4857  
 ccatttgaat aaaatgacaa taactaaagc tagttaatgt cagtacatt aaactaactc 4917  
 caggattcag gagttttaat gttagaattt agatttaaca gatagagtgt ggcttcattt 4977  
 gtccatggta gcccatctct cctaagacct tttctagtct gtcttcctgc cttcgaactt 5037  
 gatgacagta aaacctgtt tagtattctc ttgtgcattt ggtttgttgg ttagccgact 5097  
 gtcttgaaac tattcatitt gcttctagtt ttatttlaca gaggtagcat tgggtgggtt 5157  
 tttttttttt ttctgtctct gtgtttgaag tttcagtttc tgttttctag gtaaggctta 5217

tttttgatta gcagtcaatg gcaaagaaaa agtaaatcaa agatgacttc ttttcaaaat 5277  
gtagggccct tttattgcac ttttaactca gatgaattta taaattatta atcttgatac 5337  
taaggatttg ttactttttt gcatattagg ttaattttta ccttacatgt gagagtcitta 5397  
ccactaagcc attctgtctc tgtactgttg ggaagttttg gaaaccctg ccagtgatct 5457  
ggtagatgac tgatgattta tttaaagagc cgttgatgcc tccaggaaac ttaagtattt 5517  
tattaatata tatataggaa ttttttttta ttttgctttg tctttctctc ccttctttta 5577  
tctcatgtt cattcttcaa accagtgttt tggaagtatg catgcaggcc tataaatgaa 5637  
aaacacaatt ctttatgtgt atagcatgtg tattaatgtc taactacata cgcaaaaact 5697  
tccittacag aggttcggac taacatttca catgcacatt tcaaaacaag atgtgtcatg 5757  
aaaacagccc ctttacctgc caagacaagc agggctatat ttcagtgaca gctggatatt 5817  
ttgtttctga aagtgaatct cataatatat atatgtattt cacattatta tgactagaag 5877  
tatgtaagaa atgatcagaa caaaagaaaa tttctatttt catgcaaata ttttcatca 5937  
gtcatcactc tcaaatataa attaaaatat aacactcctg aatgccctgag gcacgatctg 5997  
gattttaaat gtgtggattt cattgaaaag aagctctcca cccacttggg atttcaagaa 6057  
aatitaaaac gatcccaagg aaagatgatt tgtatgttaa agtgactgca caagtaaaag 6117  
tccaatgttg tgtgcatgaa aaggattcct tggttatgtg cagggaatca tctcacatgc 6177  
tgtttttccct atttggtttg agaaacaggc tgacactatt ctctttgatt agaaaataaa 6237  
ctcataaaac tcataatgtt gatataatca agatgttaac cactataaat atgtagaaga 6297

ggaagtttta aatagacctt aagctggcat tgtgaaggaa caccatggta gactcttttt 6357  
ggtaatggta ttttgtatct aatgaaatgc agtataaagg ttggatgaagt gtaataataa 6417  
ttgtgtaaac aaatcctgtt taatagaaga gatgtacaga atcgtttttg tactgtatct 6477  
tgaaacttgt gaaataaaga ttccactttt ggatatcctg tatgctgtaa tataaccacaa 6537  
ccaagcaccc ttccagaca gacttttttt aagctgaatg aatccaattt tttaatgttt 6597  
tttgaaattt cagaagcttc tgaaaacatt cacttgtggc aatttgaatt tatctttcat 6657  
tttaaactcc tgaaattcag atttttacaa gtccaatatt gccctaggga gaacatgaat 6717  
ttgctaagaa atgttatctt ttaaatctct gatatctttg tcttgaagca gccttgatat 6777  
gtagtaagcg tgattcactt tagcctgatt ataataattt ttatctaaag ttgttttatg 6837  
catgacctg tcccaggaat ttttaagag gacttgcaga gacacgtacc acacagtaac 6897  
atttagacta aatatgctct gagtaaagga gaaatgaaaa aatattaaat caagagtga 6957  
catgtacaca aagtgaattt ggaagtgggc tacaaattta gccccagct tcccagcagg 7017  
caactcaaag aggttaactga ggtaaaatgt tccagctcag aagcattgga tcttggataa 7077  
aaagcctaca tgatgcaaac tgtggcaact gagatgtcag atctcaagat ctcaaattgt 7137  
acttgggga gcacagtcag tgaccccgaga tgacctgac tgacctaaaa gttgtggggg 7197  
aagtcggatg tcagagcctt aacaccagca ggtgaccatc caacctgggg caatgcctgc 7257  
ctgttcacca cttagcctct ttctggcaag tcattagaat gtcttccatc ttcatggct 7317  
gcaacttgat gagctacagc ctctttccta acttccitta tgatgctagt ttaggttgg 7377

tataccagct tggaagtatg cttagattaa gttacagcag atacacaaat tagatgcaag 7437  
 taaaaaaaaat cagaatttct gtagtagaaa ctacgaaaaa taaaaaggaa agtttttact 7497  
 ttttgggtat ttttttacga ataagaaaaa gtgagcgtaa atcagttcaa aaggaggtag 7557  
 tgctgtgtaa tgggctttgt acgttccttc tcatgtcact tacgtcacta cttcgccatc 7617  
 aaattgaaca agcttttaat tagatcctga aaattcacta tgctagtagt ttattggtag 7677  
 tattatattt tgagtagaac tctgatttcc cctagaggcc aaattctttt tatctgggtt 7737  
 aatttctttt aaacataaca atgttaatgc tgaattgtat attaaatccc atttctaaaa 7797  
 accacacaat tttttctcat gtaagttgag tggaatgtgg ttagttaact gaatttgaa 7857  
 tgttcatata aataatttgt tgcgtctc 7885

<210> 2

<211> 794

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Val Arg Ile Gly Leu Thr Leu Leu Leu Cys Ala Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Ser Ala Ser Ser Asp Glu Glu Gly Ser Gln Asp Glu Ser  
 20 25 30

Leu Asp Ser Lys Thr Thr Leu Thr Ser Asp Glu Ser Val Lys Asp His  
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Arg Val Val Ala Gly Gln Ile Phe Leu Asp Ser Glu  
50 55 60

Glu Ser Glu Leu Glu Ser Ser Ile Gln Glu Glu Glu Asp Ser Leu Lys  
65 70 75 80

Ser Gln Glu Gly Glu Ser Val Thr Glu Asp Ile Ser Phe Leu Glu Ser  
85 90 95

Pro Asn Pro Glu Asn Lys Asp Tyr Glu Glu Pro Lys Lys Val Arg Lys  
100 105 110

Pro Ala Leu Thr Ala Ile Glu Gly Thr Ala His Gly Glu Pro Cys His  
115 120 125

Phe Pro Phe Leu Phe Leu Asp Lys Glu Tyr Asp Glu Cys Thr Ser Asp  
130 135 140

Gly Arg Glu Asp Gly Arg Leu Trp Cys Ala Thr Thr Tyr Asp Tyr Lys  
145 150 155 160

Ala Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Glu Thr Glu Glu Glu Ala Ala Lys  
165 170 175

Arg Arg Gln Met Gln Glu Ala Glu Met Met Tyr Gln Thr Gly Met Lys  
180 185 190

Ile Leu Asn Gly Ser Asn Lys Lys Ser Gln Lys Arg Glu Ala Tyr Arg  
195 200 205

Tyr Leu Gln Lys Ala Ala Ser Met Asn His Thr Lys Ala Leu Glu Arg  
210 215 220

Val Ser Tyr Ala Leu Leu Phe Gly Asp Tyr Leu Pro Gln Asn Ile Gln  
225 230 235 240

Ala Ala Arg Glu Met Phe Glu Lys Leu Thr Glu Glu Gly Ser Pro Lys  
245 250 255

Gly Gln Thr Ala Leu Gly Phe Leu Tyr Ala Ser Gly Leu Gly Val Asn  
260 265 270

Ser Ser Gln Ala Lys Ala Leu Val Tyr Tyr Thr Phe Gly Ala Leu Gly  
275 280 285

Gly Asn Leu Ile Ala His Met Val Leu Gly Tyr Arg Tyr Trp Ala Gly  
290 295 300

Ile Gly Val Leu Gln Ser Cys Glu Ser Ala Leu Thr His Tyr Arg Leu  
305 310 315 320

Val Ala Asn His Val Ala Ser Asp Ile Ser Leu Thr Gly Gly Ser Val  
325 330 335



Val Gln Arg Ile Arg Leu Pro Asp Glu Val Glu Asn Pro Gly Met Asn  
340 345 350

Ser Gly Met Leu Glu Glu Asp Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln Phe Leu Ala  
355 360 365

Glu Lys Gly Asp Val Gln Ala Gln Val Gly Leu Gly Gln Leu His Leu  
370 375 380

His Gly Gly Arg Gly Val Glu Gln Asn His Gln Arg Ala Phe Asp Tyr  
385 390 395 400

Phe Asn Leu Ala Ala Asn Ala Gly Asn Ser His Ala Met Ala Phe Leu  
405 410 415

Gly Lys Met Tyr Ser Glu Gly Ser Asp Ile Val Pro Gln Ser Asn Glu  
420 425 430

Thr Ala Leu His Tyr Phe Lys Lys Ala Ala Asp Met Gly Asn Pro Val  
435 440 445

Gly Gln Ser Gly Leu Gly Met Ala Tyr Leu Tyr Gly Arg Gly Val Gln  
450 455 460

Val Asn Tyr Asp Leu Ala Leu Lys Tyr Phe Gln Lys Ala Ala Glu Gln  
465 470 475 480

Gly Trp Val Asp Gly Gln Leu Gln Leu Gly Ser Met Tyr Tyr Asn Gly  
485 490 495

Ile Gly Val Lys Arg Asp Tyr Lys Gln Ala Leu Lys Tyr Phe Asn Leu  
500 505 510

Ala Ser Gln Gly Gly His Ile Leu Ala Phe Tyr Asn Leu Ala Gln Met  
515 520 525

His Ala Ser Gly Thr Gly Val Met Arg Ser Cys His Thr Ala Val Glu  
530 535 540

Leu Phe Lys Asn Val Cys Glu Arg Gly Arg Trp Ser Glu Arg Leu Met  
545 550 555 560

Thr Ala Tyr Asn Ser Tyr Lys Asp Gly Asp Tyr Asn Ala Ala Val Ile  
565 570 575

Gln Tyr Leu Leu Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Val Ala Gln Ser Asn  
580 585 590

Ala Ala Phe Ile Leu Asp Gln Arg Glu Ala Ser Ile Val Gly Glu Asn  
595 600 605

Glu Thr Tyr Pro Arg Ala Leu Leu His Trp Asn Arg Ala Ala Ser Gln  
610 615 620

Gly Tyr Thr Val Ala Arg Ile Lys Leu Gly Asp Tyr His Phe Tyr Gly  
625 630 635 640

Phe Gly Thr Asp Val Asp Tyr Glu Thr Ala Phe Ile His Tyr Arg Leu  
645 650 655

Ala Ser Glu Gln Gln His Ser Ala Gln Ala Met Phe Asn Leu Gly Tyr  
660 665 670

Met His Glu Lys Gly Leu Gly Ile Lys Gln Asp Ile His Leu Ala Lys  
675 680 685

Arg Phe Tyr Asp Met Ala Ala Glu Ala Ser Pro Asp Ala Gln Val Pro  
690 695 700

Val Phe Leu Ala Leu Cys Lys Leu Gly Val Val Tyr Phe Leu Gln Tyr  
705 710 715 720

Ile Arg Glu Thr Asn Ile Arg Asp Met Phe Thr Gln Leu Asp Met Asp  
725 730 735

Gln Leu Leu Gly Pro Glu Trp Asp Leu Tyr Leu Met Thr Ile Ile Ala  
740 745 750

Leu Leu Leu Gly Thr Val Ile Ala Tyr Arg Gln Arg Gln His Gln Asp  
755 760 765

Met Pro Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro Arg Pro Ala Pro Pro Gln Gln  
 770 775 780

Glu Gly Pro Pro Glu Gln Gln Pro Pro Gln  
 785 790

<210> 3  
 <211> 833  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3  
 Met Ile Thr Leu Leu Leu Tyr Leu Cys Val Ile Cys Asn Ala Ile Val  
 1 5 10 15

Leu Ile Arg Ala Asp Ser Ile Ala Asp Pro Trp Pro Glu Ala Arg His  
 20 25 30

Leu Leu Asn Thr Ile Ala Lys Ser Arg Asp Pro Met Lys Glu Ala Ala  
 35 40 45

Met Glu Pro Asn Ala Asp Glu Phe Val Gly Phe Tyr Val Pro Met Asp  
 50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Asn Glu Glu Lys Asn Tyr Gln Ser Ile Trp Gln Asn  
 65 70 75 80

Glu Ile Thr Asp Ser Gln Arg His Ile Tyr Glu Leu Leu Val Gln Ser  
 85 90 95

Ser Glu Gln Phe Asn Asn Ser Glu Ala Thr Tyr Thr Leu Ser Gln Ile  
 100 105 110

His Leu Trp Ser Gln Tyr Asn Phe Pro His Asn Met Thr Leu Ala His  
115 120 125

Lys Tyr Leu Glu Lys Phe Asn Asp Leu Thr His Phe Thr Asn His Ser  
130 135 140

Ala Ile Phe Asp Leu Ala Val Met Tyr Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Asp Gln Thr Val Ile Pro Gln Asp Ser Ala Lys Ala Leu Leu  
165 170 175

Tyr Tyr Gln Arg Ala Ala Gln Leu Gly Asn Leu Lys Ala Lys Gln Val  
180 185 190

Leu Ala Tyr Lys Tyr Tyr Ser Gly Phe Asn Val Pro Arg Asn Phe His  
195 200 205

Lys Ser Leu Val Leu Tyr Arg Asp Ile Ala Glu Gln Leu Arg Lys Ser  
210 215 220

Tyr Ser Arg Asp Glu Trp Asp Ile Val Phe Pro Tyr Trp Glu Ser Tyr  
225 230 235 240

Asn Val Arg Ile Ser Asp Phe Glu Ser Gly Leu Leu Gly Lys Gly Leu  
245 250 255

Asn Ser Val Pro Ser Ser Thr Val Arg Lys Arg Thr Thr Arg Pro Asp  
260 265 270

Ile Gly Ser Pro Phe Ile Ala Gln Val Asn Gly Val Gln Met Thr Leu  
275 280 285

Gln Ile Glu Pro Met Gly Arg Phe Ala Phe Asn Gly Asn Asp Gly Asn  
290 295 300

Ile Asn Gly Asp Glu Asp Asp Glu Asp Ala Ser Glu Arg Arg Ile Ile  
305 310 315 320

Arg Ile Tyr Tyr Ala Ala Leu Asn Asp Tyr Lys Gly Thr Tyr Ser Gln  
325 330 335

Ser Arg Asn Cys Glu Arg Ala Lys Asn Leu Leu Glu Leu Thr Tyr Lys  
340 345 350

Glu Phe Gln Pro His Val Asp Asn Leu Asp Pro Leu Gln Val Phe Tyr  
355 360 365

Tyr Val Arg Cys Leu Gln Leu Leu Gly His Met Tyr Phe Thr Gly Glu  
370 375 380

Gly Ser Ser Lys Pro Asn Ile His Met Ala Glu Glu Ile Leu Thr Thr  
385 390 395 400

Ser Leu Glu Ile Ser Arg Arg Ala Gln Gly Pro Ile Gly Arg Ala Cys  
405 410 415

Ile Asp Leu Gly Leu Ile Asn Gln Tyr Ile Thr Asn Asn Ile Ser Gln  
420 425 430

Ala Ile Ser Tyr Tyr Met Lys Ala Met Lys Thr Gln Ala Asn Asn Gly  
435 440 445

Ile Val Glu Phe Gln Leu Ser Lys Leu Ala Thr Ser Phe Pro Glu Glu  
450 455 460

Lys Ile Gly Asp Pro Phe Asn Leu Met Glu Thr Ala Tyr Leu Asn Gly  
465 470 475 480

Phe Ile Pro Ala Ile Tyr Glu Phe Ala Val Met Ile Glu Ser Gly Met  
485 490 495

Asn Ser Lys Ser Ser Val Glu Asn Thr Ala Tyr Leu Phe Lys Thr Phe  
500 505 510

Val Asp Lys Asn Glu Ala Ile Met Ala Pro Lys Leu Arg Thr Ala Phe  
515 520 525

Ala Ala Leu Ile Asn Asp Arg Ser Glu Val Ala Leu Trp Ala Tyr Ser  
530 535 540

Gln Leu Ala Glu Gln Gly Tyr Glu Thr Ala Gln Val Ser Ala Ala Tyr  
545 550 555 560

Leu Met Tyr Gln Leu Pro Tyr Glu Phe Glu Asp Pro Pro Arg Thr Thr  
565 570 575

Asp Gln Arg Lys Thr Leu Ala Ile Ser Tyr Tyr Thr Arg Ala Phe Lys  
580 585 590

Gln Gly Asn Ile Asp Ala Gly Val Val Ala Gly Asp Ile Tyr Phe Gln  
595 600 605

Met Gln Asn Tyr Ser Lys Ala Met Ala Leu Tyr Gln Gly Ala Ala Leu  
610 615 620

Lys Tyr Ser Ile Gln Ala Ile Trp Asn Leu Gly Tyr Met His Glu His  
625 630 635 640

Gly Leu Gly Val Asn Arg Asp Phe His Leu Ala Lys Arg Tyr Tyr Asp  
645 650 655

Gln Val Ser Glu His Asp His Arg Phe Tyr Leu Ala Ser Lys Leu Ser  
660 665 670

Val Leu Lys Leu His Leu Lys Ser Trp Leu Thr Trp Ile Thr Arg Glu  
675 680 685

Lys Val Asn Tyr Trp Lys Pro Ser Ser Pro Leu Asn Pro Asn Glu Asp  
 690 695 700

Thr Gln His Ser Lys Thr Ser Trp Tyr Lys Gln Leu Thr Lys Ile Leu  
 705 710 715 720

Gln Arg Met Arg His Lys Glu Asp Ser Asp Lys Ala Ala Glu Asp Ser  
 725 730 735

His Lys His Arg Thr Val Val Gln Asn Gly Ala Asn His Arg Gly Asp  
 740 745 750

Asp Gln Glu Glu Ala Ser Glu Ile Leu Gly Phe Gln Met Glu Asp Leu  
 755 760 765

Val Thr Met Gly Cys Ile Leu Gly Ile Phe Leu Leu Ser Ile Leu Met  
 770 775 780

Ser Thr Leu Ala Ala Arg Arg Gly Trp Asn Val Arg Phe Asn Gly Ala  
 785 790 795 800

Gln Leu Asn Ala Asn Gly Asn Arg Gln Gln Glu Gln Gln Gln Gln  
 805 810 815

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Gly Trp Asp Phe Asn Val Gln Ile Phe Ala  
 820 825 830

Ile

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>



<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 4

cuugauauagg accagcuut t

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 5

aaagcugguc cauaucaagt t

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 6

ggcuacgucc aggagcgcat t

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 7

ugcguccug gacguagcct t

21

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 8

gguguucuuu gggcaacuga gtt

23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA/RNA binding molecule

<400> 9

cucaguugcc caaagaacac ctt

23

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 10

ggctgaacag ggctatg

17

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 11

ccgctcgagt tactgtggtg gctgctgctc

30

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 12

agctggtgtt tggctttgag

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 13

gggtggcccc tgatccgcag

20

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 14

aggtgaaggt cggagtcaac gga

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 15

agtccttcca cgatacaaaa gtg

24

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 48/00, A61P19/02, 25/00, 29/00,  
35/00//C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00-45/08, 31/00-31/80, 48/00, A61P1/00-43/00,  
C12N15/00-15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), Caplus (STN),  
REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 02/052007 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 04 July, 2002 (04.07.02), Claims; examples; industrial applicability	1, 2, 7 3-6
X A	JP 2003-89647 A (Takada Seiyaku Kabushiki Kaisha), 28 March, 2003 (28.03.03), Full text	1, 7 2-6
X A	WO 2003/018033 A1 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA), 06 March, 2003 (06.03.03), Claims; examples	1, 7 2-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered  
to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international  
filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the  
priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority  
date and not in conflict with the application but cited to understand  
the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such combination  
being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 May, 2005 (30.05.05)

Date of mailing of the international search report

14 June, 2005 (14.06.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2002-10784 A (Teijin Ltd.), 15 January, 2002 (15.01.02), Full text	1, 7 2-6
X A	JP 2003-525243 A (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA), 26 August, 2003 (26.08.03), Full text	1, 7 2-6
X A	JP 7-324035 A (LTT Institute Co., Ltd.), 12 December, 1995 (12.12.95), Full text	1, 7 2-6
X A	JP 7-145062 A (LTT Institute Co., Ltd.), 06 June, 1995 (06.06.95), Full text	1, 7 2-6
X A	WO 01/76630 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 October, 2001 (18.10.01), Claims; examples	1, 7 2-6
X A	WO 01/21793 A1 (Nobuyuki MIYASAKA), 29 March, 2001 (29.03.01), Full text	1, 7 2-6
X A	WO 00/53194 A1 (Takada Seiyaku Kabushiki Kaisha), 14 September, 2000 (14.09.00), Full text	1, 7 2-6
Y A	JP 2001-503785 A (ANGIOTECH PHARMACEUTICALS, INC.), 21 March, 2001 (21.03.01), Full text	1, 2, 7 3-6
X A	WO 00/38693 A1 (Toray Industries, Inc.), 06 July, 2000 (06.07.00), Full text	13, 19, 20 14-18
X A	WO 01/51480 A1 (Takara Shuzo Kabushiki Kaisha), 19 July, 2001 (19.07.01), Claims; examples	13, 20 14-19
X A	WO 01/95921 A1 (Kabushiki Kaisha Gifu Shellac Seizosho), 20 December, 2001 (20.12.01), Claims; test examples	13, 19, 20 14-18
X A	WO 97/47622 A1 (Japan Tobacco Inc.), 18 December, 1997 (18.12.97), Claims; examples	13, 20 14-19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 8-73453 A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 March, 1996 (19.03.96), Full text	13, 19, 20 14-18
L	CATTANEO, M., et al., Identification of a region within SEL1L protein required for tumour growth inhibition. Gene, 2004, 326, pages 149 to 156 (Disclosed are that tumour growth is inhibited by SEL1L having Hrd3 motif and that inhibiting action of tumour cell growth is weakened by deletion mutant of SEL1L)	1-7
A	WO 99/28457 A1 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 10 June, 1999 (10.06.99),	1-7
A	AMANO, T., et al., Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy., Genes & Development, 2003, 17, pages 2436 to 2449	1-7
A	GARDNER, R.G., et al., Endoplasmic Reticulum Degradation Requires Lumen to Cytosol Signaling: Transmembrane Control of Hrd1p by Hrd3p., Journal of Cell Biology, 2000, 151(1), pages 69 to 82	1-7
P, X P, A	WO 2005/018675 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 03 March, 2005 (03.03.05), Claims; examples	1, 2, 7 3-6
P, A	Naoko YAGISHITA et al., "Kansetsu Rheumatism Hassho no Byoin Bunshi Synoviolin", Igaku no Ayumi, 02 October, 2004 (02.10.04), 211(1), pages 124 to 128	1-7
T	YAGISHITA, N., et al., Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis., Journal of Biological Chemistry, 2005, 280, pages 7909 to 7916	1-7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2005/005311

WO 02/052007 A1	2002.07.04	EP 1352961 A1	2003.10.15
		KR 2003074664 A	2003.09.19
		AU 2002216399 A1	2002.07.08
		CN 1491280 A	2004.04.21
		US 2004/0152871 A1	2004.08.05
JP 2003-89647 A	2003.03.28	WO 00/53194 A1	2000.09.14
		AU 200029425 A	2000.09.28
		EP 1166788 A1	2002.01.02
		SK 200101250 A3	2002.02.05
		CZ 200103110 A3	2002.01.16
		KR 2001108343 A	2001.12.07
		CN 1343122 A	2002.04.03
		US 6608043 B1	2003.08.19
WO 2003/018033 A1	2003.03.06	JP 2005-508893 A	2005.04.07
		US 2003/0064958 A1	2003.04.03
		EP 1420801 A1	2004.05.26
		AU 2002325113 A1	2003.03.10
		KR 2004032992 A	2004.04.17
		US 6812220 B2	2004.11.02
		MX 2004001876 A1	2004.06.01
		CN 1547478 A	2004.11.17
JP 2002-10784 A	2002.01.15	(Family: none)	
JP 2003-525243 A	2003.08.26	WO 01/64214 A2	2001.09.07
		EP 1261337 A2	2002.12.04
		US 2003/0139353 A1	2003.07.24
JP 7-324035 A	1995.12.12	(Family: none)	
WO 01/76630 A1	2001.10.18	AU 200146850 A	2001.10.23
		EP 1275398 A1	2003.01.15
		US 2003/0152572 A1	2003.08.14
WO 01/21793 A1	2001.03.29	AU 200073202 A	2001.04.24
		EP 1225223 A1	2002.07.24
WO 00/53194 A1	2000.09.14	AU 200029425 A	2000.09.28
		EP 1166788 A1	2002.01.02
		SK 200101250 A3	2002.02.05
		CZ 200103110 A3	2002.01.16
		KR 2001108343 A	2001.12.07
		CN 1343122 A	2002.04.03
		JP 2003-89647 A	2003.03.28
		US 6608043 B1	2003.08.19



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2005/005311

JP 2001-503785 A	2001.03.21	WO 98/24427 A2	1998.06.11
		AU 9851132 A	1998.06.29
		NO 9902641 A	1999.07.30
		EP 941089 A2	1999.09.15
		CN 1246791 A	2000.03.08
		BR 9713673 A	2000.10.31
		EP 1070502 A2	2001.01.24
		EP 1090637 A2	2001.04.11
		EP 1092433 A2	2001.04.18
		MX 9905073 A1	2000.03.01
		KR 2000069265 A	2000.11.25
		AU 200148029 A	2001.08.02
		NZ 336094 A	2001.08.31
		US 2002/0013298 A1	2002.01.31
		US 2002/0037919 A1	2002.03.28
		JP 2002-226399 A	2002.08.14
		US 2002/0183380 A1	2002.12.05
		US 6495579 B1	2002.12.17
		US 6515016 B2	2003.02.04
		US 2003/0157187 A1	2003.08.21
WO 00/38693 A1	2000.07.06	US 6689803 B2	2004.02.10
		AU 2004200715 A1	2004.03.18
		EP 1057488 A1	2000.12.06
		CN 1298305 A	2001.06.06
WO 01/51480 A1	2001.07.19	US 6579860 B1	2003.06.17
		EP 1254902 A1	2002.11.06
		KR 2003016216 A	2003.02.26
		CN 1418207 A	2003.05.14
WO 01/95921 A1	2001.12.20	US 2003/0158250 A1	2003.08.21
		AU 200174519 A	2001.12.24
		EP 1312372 A1	2003.05.21
		US 2003/0170329 A1	2003.09.11
WO 97/47622 A1	1997.12.18		
		AU 9731061 A	1998.07.07
		NO 9805820 A	1999.02.01
		EP 934940 A1	1999.08.11
		CN 1227555 A	1999.09.01
		BR 9710453 A	1999.08.17
		MX 9810605 A1	1999.03.14
JP 8-73453 A	1996.03.19	KR 2000016732 A	2000.03.25
		(Family: none)	
WO 99/28457 A1	1999.06.10		
		JP 11-215987 A	1999.08.10
		EP 1038957 A1	2000.09.27
		CN 1280617 A	2001.01.17
		US 2004/0204574 A1	2004.10.14
WO 2005/018675 A1	2005.03.03	US 6822083 B1	2004.11.23
		(Family: none)	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/005311

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8-12  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as set forth in claims 8 to 12 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.  
(Article 17(2)(a)(i) of the PCT, Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT)
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- o With respect to claims 1-7 and 13-20:

All the inventions of claims 2-7 directly or indirectly quote claim 1, and it appears that the technical matter common to the inventions of claims 1-7 is "pharmaceutical composition capable of suppressing the multiplication of synovial cells" claimed in claim 1.

On the other hand, all the inventions of claims 14-20 directly or indirectly quote claim 13, and it appears that the technical matter common to the inventions of claims 13-20 is "pharmaceutical composition comprising a substance capable of suppressing the production of interleukin 6" claimed in claim 1.

(Continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Although it appears that the technical matter common to the inventions of claims 1-7 and the inventions of claims 13-20 is a pharmaceutical composition per se, the pharmaceutical composition per se is a technical matter publicly known by persons skilled in the art to which the inventions pertain. Further, with respect to the "pharmaceutical composition capable of suppressing the multiplication of synovial cells" and "pharmaceutical composition comprising a substance capable of suppressing the production of interleukin 6" as well, they are a publicly known matter as respectively described in JP 2003-89647 A and WO 00/38693 A1, and hence this matter cannot be special technical features.

Consequently, these inventions cannot be stated as being linked with each other so as to form a single general inventive concept and hence fail to satisfy the requirement of unity of invention.

Therefore, it appears that the claims 1-7 and 13-20 claim the following two inventions not forming a single general inventive concept:

- 1) invention of claims 1-7, and
- 2) invention of claims 13-20.

With respect to claims 1-3, 7, 13-15, 19 and 20:

All the inventions of these claims relate to pharmaceuticals, and the active ingredients thereof are only defined by their functions.

However, since from provided description, what chemical structures give compounds with the functions cannot be stated as being obvious to even persons skilled in the art to which the inventions pertain, simply specifying of the functions is not sufficient to clarify what compounds are active ingredients.

Further, according to the contents of the description of this application, the compositions whose concrete results showing the functions are ascertained are only those containing nucleic acids specified in claims 4 to 6 and 16 to 18. Since there is no description as to those containing other ingredients, it does not appear that with respect to those as well, exhibiting of the same activity as mentioned in the description has been shown.

Therefore, in view of the way of drafting of claims 1-3, 7, 13-15, 19 and 20, the inventions of these claims are unclear. Further, in view of the way of drafting of the description, it cannot be stated that the description is sufficiently clear and complete for the inventions of the claims to be carried out by persons skilled in the art to which the inventions pertain, and it cannot be stated that the description is drafted so as to fully support the inventions of these claims (PCT Article 5 and Article 6).

(continued to next page)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

As the description of this application is lacking in the support for the inventions of these claims, it is to be noted that in the preparation of this international search report, prior art search has been limited to those whose active ingredients are nucleic acids specified in claims 4 to 6 and 16 to 18 and rational scope based on the contents of the description.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 31/7088, 48/00, A61P19/02, 25/00, 29/00, 35/00 // C12N15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00-45/08, 31/00-31/80, 48/00, A61P1/00-43/00, C12N15/00-15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), Cplus (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 02/052007 A1 (株式会社ロコモジェン) 2002. 07. 04, 請求の範囲, 実施例, 産業上の利用の可能性	1, 2, 7 3-6
X A	JP 2003-89647 A (高田製薬株式会社) 2003. 03. 28, 全文	1, 7 2-6
X A	WO 2003/018033 A1 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA) 2003. 03. 06, 請求の範囲, 実施例	1, 7 2-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 05. 2005

国際調査報告の発送日

14. 6. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒木 英 則

4 C

9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP 2002-10784 A(帝人株式会社) 2002. 01. 15, 全文参照	1, 7 2-6
X A	JP 2003-525243 A(ザ エンバーシティ オブ フリッシュ コロンビア) 2003. 08. 26, 全文参照	1, 7 2-6
X A	JP 7-324035 A(株式会社エルティーティー研究所) 1995. 12. 12, 全 文参照	1, 7 2-6
X A	JP 7-145062 A(株式会社エルティーティー研究所) 1995. 06. 06, 全 文参照	1, 7 2-6
X A	WO 01/76630 A1(協和醗酵工業株式会社) 2001. 10. 18, 請求の範囲, 実施例	1, 7 2-6
X A	WO 01/21793 A1(宮坂 信之) 2001. 03. 29, 全文参照	1, 7 2-6
X A	WO 00/53194 A1(高田製薬株式会社) 2000. 09. 14, 全文参照	1, 7 2-6
Y A	JP 2001-503785 A(アンジ オテック ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 2001. 03. 21, 全文参照	1, 2, 7 3-6
X A	WO 00/38693 A1(東レ株式会社) 2000. 07. 06, 全文参照	13, 19, 20 14-18
X A	WO 01/51480 A1(寶酒造株式会社) 2001. 07. 19, 請求の範囲, 実施例	13, 20 14-19
X A	WO 01/95921 A1(株式会社岐阜セラック製造所) 2001. 12. 20, 請求の範囲, 試験例	13, 19, 20 14-18
X A	WO 97/47622 A1(日本たばこ産業株式会社) 1997. 12. 18, 請求の範囲, 実施例	13, 20 14-19
Y A	JP 8-73453 A(大塚製薬株式会社) 1996. 03. 19, 全文参照	13, 19, 20 14-18

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
L	CATTANEO, M., <i>et al.</i> , Identification of a region within SEL1L protein required for tumour growth inhibition. <i>Gene</i> , 2004, 326, pp. 149-156 (Hrd3 モチーフを有する SEL1L により癌の増殖が阻害されること、および SEL1L の deletion mutant によりガン細胞成長抑制作用が減弱されることが記載されている。)	1 - 7
A	WO 99/28457 A1 (大塚製薬株式会社) 1999. 06. 10	1 - 7
A	AMANO, T., <i>et al.</i> , Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. <i>Genes &amp; Development</i> , 2003, 17, pp. 2436-2449	1 - 7
A	GARDNER, R. G., <i>et al.</i> , Endoplasmic Reticulum Degradation Requires Lumen to Cytosol Signaling: Transmembrane Control of Hrd1p by Hrd3p. <i>Journal of Cell Biology</i> , 2000, 151(1), pp. 69-82	1 - 7
P X P A	WO 2005/018675 A1 (株式会社ロコモジェン) 2005. 03. 03 請求の範囲, 実施例	1, 2, 7 3 - 6
P A	八木下 尚子ら, 関節リウマチ発症の病因分子シノビオリン, 医学のあゆみ, 2004. 10. 02, 211(1), pp. 124-128	1 - 7
T	YAGISHITA, N., <i>et al.</i> , Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis. <i>Journal of Biological Chemistry</i> , 2005, 280, pp. 7909-7916	1 - 7

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲8から12に係る発明は、治療による人体の処置方法にあたる。  
(PCT17条(2)(a)(i)、PCT規則39.1(iv))
2. ☐ 請求の範囲                      は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

○請求の範囲1-7, 13-20について

請求の範囲2-7に係る発明はいずれも請求の範囲1を直接または間接的に引用するものであって、請求の範囲1-7に係る発明における共通の技術的事項とは、請求の範囲1に記載される「滑膜細胞の増殖を抑制する医薬組成物」にあるものと認められる。

一方、請求の範囲14-20に係る発明はいずれも請求の範囲13を直接または間接的に引用するものであって、請求の範囲13-20に係る発明における共通の技術的事項とは、請求の範囲1に記載される「インターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物」にあるものと認められる。  
(以下、別紙に続く。)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



**第Ⅲ欄の続き**

ここで、請求の範囲 1-7 に係る発明と請求の範囲 13-20 に係る発明とに共通の技術的事項とは、医薬組成物そのものであるものと認められるが、医薬組成物自体は当業者に周知の技術的事項であり、また、「滑膜細胞の増殖を抑制する医薬組成物」や「インターロイキン-6 の産生を抑制する物質を含む医薬組成物」についても、それぞれ JP 2003-89647 A や WO 00/38693 A1 にあるように公知の事項であるから、これらの点をもって特別の技術的特徴とすることはできない。

したがって、これらの発明が単一の一般的発明概念を形成するように連関したものということとはできず、発明の単一性を有さないものとなっている。

よって、請求の範囲 1-7 および 13-20 には、単一の一般的発明概念を形成しない以下の 2 発明が記載されたものと認められる。

- 1) 請求の範囲 1-7 に係る発明
- 2) 請求の範囲 13-20 に係る発明

**請求の範囲 1-3, 7, 13-15, 19, 20 について**

これらの請求の範囲に係る発明はいずれも医薬に関するものであって、その有効成分はその機能のみで限定されたものである。

しかしながら、このような記載によっては、いかなる化学構造を有するものであれば当該機能を有するものであるのかが当業者といえども自明なものということとはできないから、単に当該機能が特定されるのみではいかなる化合物が有効成分となるのかが不明確である。

また、本願明細書の記載によれば、当該機能を有するものとして具体的にその結果が確認されているのは請求の範囲 4 から 6 および 16 から 18 に記載された核酸を用いた場合のみであって、他の成分を用いた場合については何ら記載されていないため、このような場合についてまで明細書に記載されたものと同様の作用を示すことが示されたものとは認められない。

したがって、請求の範囲 1-3, 7, 13-15, 19, 20 の記載によってはこれらの請求の範囲に係る発明が不明確であり、また、このような明細書の記載によっては、当業者がこれらの請求の範囲に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されたものとはいえず、これらの請求の範囲に係る発明について十分な裏付けとなるよう記載されたものということとはできない (PCT 5 条および 6 条)。

そして、本願明細書の記載はこれらの請求の範囲に係る発明に関する裏付けを欠くものとなっているから、本国際調査報告の作成に際しては、有効成分が請求の範囲 4 から 6 および 16 から 18 に記載された核酸の場合のほか、明細書の記載からみて合理的な範囲に限定して先行技術調査を行っている点に留意されたい。

WO 02/052007	A1	2002. 07. 04	EP 1352961	A1	2003. 10. 15
			KR 2003074664	A	2003. 09. 19
			AU 2002216399	A1	2002. 07. 08
			CN 1491280	A	2004. 04. 21
			US 2004/0152871	A1	2004. 08. 05
JP 2003- 89647	A	2003. 03. 28	WO 00/53194	A1	2000. 09. 14
			AU 200029425	A	2000. 09. 28
			EP 1166788	A1	2002. 01. 02
			SK 200101250	A3	2002. 02. 05
			CZ 200103110	A3	2002. 01. 16
			KR 2001108343	A	2001. 12. 07
			CN 1343122	A	2002. 04. 03
			US 6608043	B1	2003. 08. 19
WO 2003/018033	A1	2003. 03. 06	JP 2005-508893	A	2005. 04. 07
			US 2003/0064958	A1	2003. 04. 03
			EP 1420801	A1	2004. 05. 26
			AU 2002325113	A1	2003. 03. 10
			KR 2004032992	A	2004. 04. 17
			US 6812220	B2	2004. 11. 02
			MX 2004001876	A1	2004. 06. 01
			CN 1547478	A	2004. 11. 17
JP 2002-10784	A	2002. 01. 15	ファミリーなし		
JP 2003-525243	A	2003. 08. 26	WO 01/64214	A2	2001. 09. 07
			EP 1261337	A2	2002. 12. 04
			US 2003/0139353	A1	2003. 07. 24
JP 7-324035	A	1995. 12. 12	ファミリーなし		
WO 01/76630	A1	2001. 10. 18	AU 200146850	A	2001. 10. 23
			EP 1275398	A1	2003. 01. 15
			US 2003/0152572	A1	2003. 08. 14
WO 01/21793	A1	2001. 03. 29	AU 200073202	A	2001. 04. 24
			EP 1225223	A1	2002. 07. 24

WO 00/53194	A1	2000. 09. 14	AU 200029425	A	2000. 09. 28
			EP 1166788	A1	2002. 01. 02
			SK 200101250	A3	2002. 02. 05
			CZ 200103110	A3	2002. 01. 16
			KR 2001108343	A	2001. 12. 07
			CN 1343122	A	2002. 04. 03
			JP 2003-89647	A	2003. 03. 28
			US 6608043	B1	2003. 08. 19
JP 2001-503785	A	2001. 03. 21	WO 98/24427	A2	1998. 06. 11
			AU 9851132	A	1998. 06. 29
			NO 9902641	A	1999. 07. 30
			EP 941089	A2	1999. 09. 15
			CN 1246791	A	2000. 03. 08
			BR 9713673	A	2000. 10. 31
			EP 1070502	A2	2001. 01. 24
			EP 1090637	A2	2001. 04. 11
			EP 1092433	A2	2001. 04. 18
			MX 9905073	A1	2000. 03. 01
			KR 2000069265	A	2000. 11. 25
			AU 200148029	A	2001. 08. 02
			NZ 336094	A	2001. 08. 31
			US 2002/0013298	A1	2002. 01. 31
			US 2002/0037919	A1	2002. 03. 28
			JP 2002-226399	A	2002. 08. 14
			US 2002/0183380	A1	2002. 12. 05
			US 6495579	B1	2002. 12. 17
			US 6515016	B2	2003. 02. 04
			US 2003/0157187	A1	2003. 08. 21
WO 00/38693	A1	2000. 07. 06	US 6689803	B2	2004. 02. 10
			AU 2004200715	A1	2004. 03. 18
			EP 1057488	A1	2000. 12. 06
WO 01/51480	A1	2001. 07. 19	CN 1298305	A	2001. 06. 06
			US 6579860	B1	2003. 06. 17
			EP 1254902	A1	2002. 11. 06
			KR 2003016216	A	2003. 02. 26
			CN 1418207	A	2003. 05. 14
			US 2003/0158250	A1	2003. 08. 21

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 5 / 0 0 5 3 1 1

WO 01/95921 A1	2001.12.20	AU 200174519	A	2001.12.24
		EP 1312372	A1	2003.05.21
		US 2003/0170329	A1	2003.09.11
WO 97/47622 A1	1997.12.18	AU 9731061	A	1998.07.07
		NO 9805820	A	1999.02.01
		EP 934940	A1	1999.08.11
		CN 1227555	A	1999.09.01
		BR 9710453	A	1999.08.17
		MX 9810605	A1	1999.03.14
		KR 2000016732	A	2000.03.25
ファミリーなし				
JP 8-73453 A	1996.03.19			
WO 99/28457 A1	1999.06.10	JP 11-215987	A	1999.08.10
		EP 1038957	A1	2000.09.27
		CN 1280617	A	2001.01.17
		US 2004/0204574	A1	2004.10.14
		US 6822083	B1	2004.11.23
ファミリーなし				
WO 2005/018675 A1	2005.03.03			